UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER 2μm-DNA IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GERALD PREIBISCH

aus Rastatt

1983

UNIV.
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0001

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER 2μm-DNA IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GERALD PREIBISCH

aus Rastatt

1983

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 1983

für den Dekan:	Prof. Dr. O. Hess
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. C.P. Hollenberg
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Herrmann

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg danke ich ganz herzlich für die Anregung dieser Arbeit und seine Betreuung und Förderung bei ihrer Durchführung.

Herrn Prof. Dr. W. Beermann danke ich für die Unterstützung aus Mitteln des Max-Planck-Instituts für Biologie, Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Pejdal für das Anfertigen der Reinschrift, meinem Vater Walter Preibisch für die Reinzeichnung eines Großteils der Schemata und meiner Frau Ursula und Herrn A.Hils für ihre Mithilfe bei den photographischen Arbeiten.

Ein Dankeschön allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie in Düsseldorf und des Labors am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen für die kollegiale Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden 2.1 Stämme und Medien S.9 - 2.2 Plasmide S.10 - 2.3 RNA-Präparationen aus Hefe S.11 - 2.4 Polysomen-Präparation S.11 - 2.5 oligo(dT)-Säule S.12 - 2.6 "Northern"-Technik S.12 - 2.7 "Northern" mit einzelsträngiger fd-DNA S.13 - 2.8 S1-Kartierung der Trasnkripte S.13 - 2.9 Analyse von DNA nach Southern S.14 - 2.10 Herstellung der DNA-Proben zur Hybridisierung und "Nick-Translation" S.15 - 2.11 Hefe-Transformation S.15 - 2.12 DNA aus Hefe-Minilysaten S.16 - 2.13 Transformation von E.coli S.17 - 2.14 Minilysate von E.coli (nach Clewell & Helinski) S.17 - 2.15 Minilysate von E.coli (Holmes & Quigley) S.18 - 2.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli S.18 - 2.17 Konstruktion von Rekombinantplasmiden S.19 - 2.18 Konstruktion von rekombinanten fd-Phagen S.19 - 2.19 Plaque-Hybridisierung S.20 - 2.20 Bestimmung der relativen Orientierung der 2µm-Fragmente in den rekombinanten fd-Phagen S.20 - 2.21 Bestimmung der absoluten Orientierung der 2µm-Fragmente in den rekombinanten fd-Phagen S.21 - 2.22 Isolierung von fd-Phagen S.21 - 2.23 Isolierung von einzelsträngiger Phagen-DNA S.22 - 2.24 in vitro-Test auf FLP-Aktivität in E.coli S.22 - 2.25 Abkürzungen S.23	9
3.	Ergebnisse Transkription	25
3.1	Untersuchung der in vivo-Transkription endogener 2µm-DNA	25
3.1.1	Nachweis der Transkripte von 2µm-DNA im Hefestamm H1	26
3.1.2	Anmerkungen zur Technik	29

UNIV. LIBRARY BSL

Seite

3.1.3 Transkription der 2µmLEU2-DNA im Hefestamm YT6001 30
3.2 Kartierung der Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA 31
3.3 Untersuchung der Transkriptionsrichtung 38
3.4 S1-Kartierung einiger Transkripte der 2µm-DNA 45
3.5 Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA in polysomaler RNA 50
3.6 Menge der Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA in der Hefezelle 51
3.7 Untersuchung der Transkription von Rekombinantplasmiden der 2µm-DNA mit bakteriellem Vektor 55

4. Ergebnisse zur FLP-abhängigen Rekombination 63
4.1 Konstruktion der Plasmidreihe pG53 63
4.2 Das Plasmid pG53XY 67
4.3 Expresssion der FLP-Aktivität in E.coli 70
4.4 Rekombination der Plasmide pG53A, C und BD in Hefe 75
4.5 Test der FLP-Rekombinationsaktivität in vitro 76
4.6 Koexistenz von pK21 und pG53-Plasmiden 79
4.6.1 Intermolekulare Rekombination 79
4.6.2 Inversion von pK21 90
4.7 Inversion anderer flp-Plasmide in E.coli-Stämmen mit FLP-Aktivität 94
4.8 Nachweis der trans-Aktivität des FLP-Gens 98

5. Diskussion 103
5.1 Transkription endogener 2µm-DNA im Hefestamm H1 103
5.2 Transkription der 2µmLEU2-DNA im Hefestamm YT6001 113
5.3 Transkription rekombinanter Derivate von 2µm-DNA in Hefe 122
5.4 Transkriptionsmodell der 2µm-DNA in Hefe 127
5.5 FLP-abhängige Rekombination in E.coli 130

6. Zusammenfassung 136

7. Literaturverzeichnis 138

1. Einleitung

Die meisten Laborstämme der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae enthalten in hoher Kopienzahl 2µm-DNA (Sinclair et al., 1967; Hollenberg et al., 1970; Guerineau et al., 1971; Clark-Walker, 1972). Sie ist eine kovalent geschlossene, zirkuläre Doppelstrang-DNA (cccDNA) mit einer Konturlänge von etwa 2µm im relaxierten Zustand (Hollenberg et al., 1970; Clark-Walker, 1973; Royer & Hollenberg, 1977). Die 2µm-DNA wurde in Escherichia coli kloniert (Beggs et al., 1976; Hollenberg et al., 1976; Cameron et al., 1977) und vollständig sequenziert (Hartley & Donelson, 1980) (Abb.1).

Sie ist 6318bp lang und enthält zwei identische, zueinander invertiert angeordnete Duplikationen von 599bp Länge (IR-Elemente), die zwischen zwei größeren Bereichen "unique"-DNA liegen, dem 2774bp großen L-Segment und dem 2346bp großen S-Segment. Die 2µm-DNA kommt in der Hefe in zwei gleich häufigen Konfigurationen des Moleküls vor, dem Typ 14 und Typ 23, die sich durch Inversion eines Segments unterscheiden (Guerineau et al., 1976; Hollenberg & Royer, 1976; Livingston & Klein, 1977; Cameron et al., 1977). Die Moleküle der beiden Formen werden in der Zelle durch eine spezifische Rekombination ineinander übergeführt (Beggs, 1978), die über eine definierte Stelle in den IR-Elementen abläuft (Broach et al., 1982). Im Bereich der Rekombinationsstelle liegt ein 120bp langer Abschnitt, der reich ist an symmetrisch angeordneten, kurzen repetierten DNA-Sequenzen, aus denen sich zwei alternative bäumchenartige Sekundärstrukturen bilden lassen (Hartley & Donelson, 1980). Sie könnten für die Rekombination und Replikation (s. weiter unten) von Bedeutung sein.

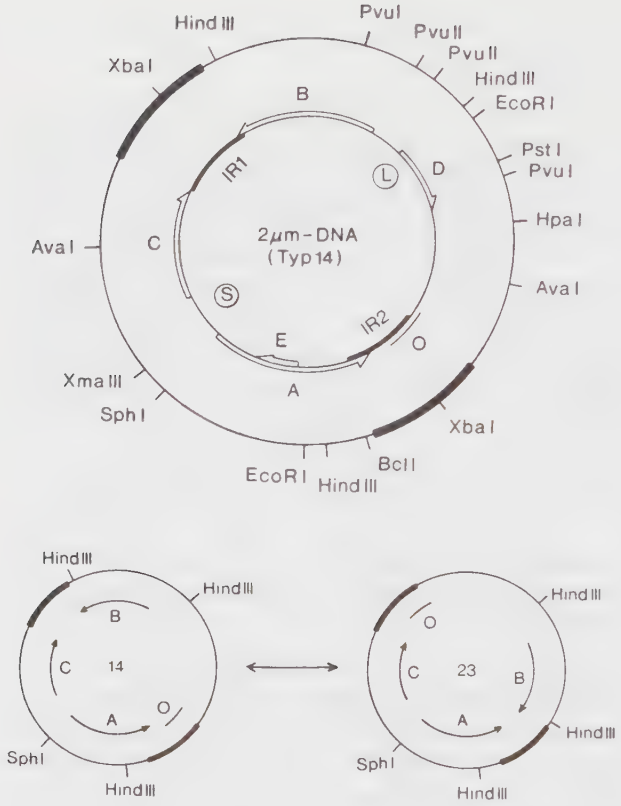


Abb.1 2µm-DNA aus Hefe.
Oben: schematische Darstellung der biologischen Karte (innerer Kreis) und der Restriktionskarte (äußerer Kreis) des Typs 14; dicke Linie: IR-Elemente; dünne Linie: L- und S-Segmente der "unique"-DNA; Pfeile: Leserahmen A-D; O: Replikationsursprung ori. Am äußeren Kreis sind die Schnittstellen aller selten schneidenden Restriktionsenzyme eingetragen, die in dieser Arbeit eine Rolle spielen (Karte nach Hartley & Donelson, 1980).
Unten: vereinfachte Darstellung der beiden Formen 14 und 23 der 2µm-DNA; einige Schnittstellen, die drei großen Leserahmen und die alternativen ori-Regionen sind eingetragen. Bezeichnungen wie oben.

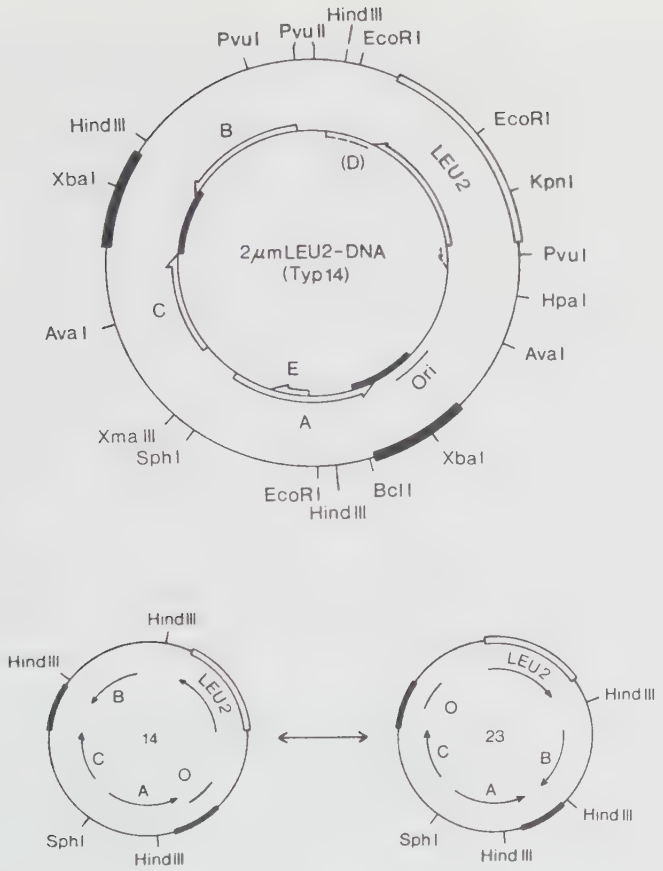


Abb.2: 2µmLEU2-DNA aus dem Hefestamm YT6001.
Darstellung wie in Abb.1; oben: weißer Balken im äußeren Kreis: LEU2-Fragment (1,25kb); am inneren Kreis ist der Leserahmen des LEU2-Gens (Erhart, 1983) und gestrichelt der unterbrochene Leserahmen D eingetragen.
Unten: vereinfachte Darstellung der beiden Formen 14 und 23 der 2µmLEU2-DNA.

Zwei IR-Elemente auf verschiedenen 2µm-Molekülen können intermolekular miteinander rekombinieren. Dabei können Multimere der 2µm-DNA entstehen (Clark-Walker, 1973; Guerineau et al., 1976; Royer & Hollenberg, 1977). Durch intermolekulare Rekombination ist auch der Austausch von L- und S-Segmenten zwischen endogener 2µm-DNA und ihren rekombinanten Derivaten möglich (Gerbaud et al., 1979; Storms et al., 1979; Dobson et al., 1980; McNeil et al., 1980; Erhart & Hollenberg, 1981). Rekombiniert z.B. pJDB219 (Beggs, 1978) mit 2µm-DNA, entsteht 2µmLEU2-DNA. Die 2µmLEU2-DNA unterscheidet sich von der endogenen 2µm-DNA nur durch die Insertion eines LEU2-Fragments in die PstI-Schnittstelle der 2µm-DNA (Beggs, 1978) (Abb.2). Wie von Erhart (1983) festgestellt wurde, trägt dieses Fragment das Allel leu2-d, das nur noch 29bp vor dem vermuteten ATG-Startcodon des LEU2-Gens enthält und schwach exprimiert, aber normal reguliert wird. Die 2µmLEU2-DNA ist von allen bekannten Derivaten der 2µm-DNA dieser in Struktur, Kopienzahl und Stabilität am ähnlichsten (Erhart, 1983).

Aufgrund der nicht-mendelschen Vererbung der 2µm-DNA (Livingston, 1977) wurde einige Zeit eine zytoplasmatische Lokalisation angenommen. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß sie in vivo die normale Nukleosomenstruktur chromosomaler DNA hat (Livingston & Hahne, 1979; Nelson & Fangman, 1979; Seligy et al., 1980) und sie assoziiert mit gefalteten Chromosomen isoliert werden kann (Taketo et al., 1980). Diese Beobachtungen deuten auf eine Lokalisation im Kern hin. Sie tritt jedoch nicht in chromosomaler DNA integriert auf (Cameron et al., 1977; Tabak, 1977). Die nicht-mendelsche Vererbung läßt sich als Folge der hohen Kopienzahl von 50 bis 100 Molekülen pro haploidem Genom (Clark-Walker & Miklos, 1974) und einem präferentiellen Einschluß in die Sporen (Brewer & Fangman, 1980) erklären.

Die Replikation der 2µm-DNA steht unter der Kontrolle von Kern-Genen, die auch die Replikation der Kern-DNA regulieren (Livingston & Kupfer, 1978). Jedes Molekül wird wie die chromosomale DNA einmal pro Zellzyklus in der S-Phase repliziert (Zakian et al., 1979). Der Bereich des Replikationsstarts ori ist etwa 350bp groß und beginnt im IR-Element bei der Stelle mit alternativen Sekundärstrukturen, an der auch die Rekombination stattfindet (Broach & Hicks, 1980). Die ori-Region enthält noch etwa 100bp des angrenzenden L-Segments, und dessen Orientierung entscheidet, an welchem IR die bidirektionale Replikation beginnt (Petes & Williamson, 1975). In Form 14 liegt der funktionelle ori am IR2, in Form 23 am IR1 (Abb.1).

Die 2µm-DNA enthält drei größere Leserahmen A, B und C, die für Proteine mit 423, 373 und 296 Aminosäuren codieren können (Hartley & Donelson, 1980). Die genauere Inspektion der Sequenzdaten ergab zwei weitere mögliche Leserahmen D und E mit 180 und 116 Tripletts (Abb.1). Auf der Suche nach Genprodukten der 2µm-DNA konnten einige von ihr codierte Proteine in E.coli Minizellen nachgewiesen werden (Hollenberg et al., 1976; Hollenberg, 1978). Bei der Untersuchung der in vivo-Transkription wurden zwei Haupttranskripte und etwa 10 weitere RNAs gefunden und grob kartiert, sowie durch in vitro-Translation der RNA 2µm-spezifische Proteine festgestellt (Broach et al., 1979). Da fast die gesamte 2µm-DNA transkribiert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, daß ausgehend von einem Promotor im L-Segment ein Primärtranskript von etwa 5000b abgelesen wird und aus diesem in mehreren Prozessierungsschritten die funktionellen mRNAs entstehen. Da das hypothetische Primärtranskript über die IR-Elemente hinweg transkribiert werden müßte, wurde der Inversion der 2µm-DNA eine Bedeutung für die Regulation der Expression von Genen des S-Segments zugeschrieben (Broach et al., 1979).

Auf der 2µm-DNA lassen sich außer den Replikations- und Rekombinationsbereichen drei weitere genetische Elemente lokalisieren, die auf die 2µm-DNA selbst einwirken. Für die Inversion der 2µm-DNA ist ein genetisches Element FLP verantwortlich, das im Bereich des Leserahmens A liegt (Broach & Hicks, 1980). Es gibt Hinweise darauf, daß es von endogener 2µm-DNA auf Rekombinantplasmide ohne FLP einwirken kann. Eine Wirkung in trans ist jedoch nicht bewiesen, da die Beteiligung intermolekularer Rekombination nicht ausgeschlossen werden konnte. Außerdem wurden zwei Elemente REP1 und REP2 in der Gegend der Leserahmen B und C kartiert, die für die Aufrechterhaltung einer hohen Kopienzahl oder ihre Herstellung nach der Transformation verantwortlich sind (Broach & Hicks, 1980; Broach et al., 1981).

Eine Funktion der 2µm-DNA für die Physiologie der Hefezelle ist nicht bekannt. Es ist bis jetzt nicht gelungen, Unterschiede zwischen S. cerevisiae-Stämmen ohne 2µm-DNA (cir°) und den isogenen cir^+-Stämmen festzustellen. Auch scheint die 2µm-DNA den Zellen unter Laborbedingungen keinen selektiven Vor- oder Nachteil zu verschaffen (Erhart, 1983). Da die bisher bekannten Funktionen der 2µm-DNA alle ihre eigene Erhaltung betreffen, hat Broach (1981 und 1982) die Möglichkeit aufgezeigt, sie als ein Beispiel für "selfish DNA" (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980) anzusehen.

Die 2µm-DNA hat als Vektor zur Transformation von Hefe mit Fremd-DNA große Bedeutung erlangt (Beggs, 1978; Übersicht bei Hollenberg, 1982). Die von mehreren Laboratorien hergestellten Hefevektoren auf der Basis der 2µm-DNA (Beggs, 1978; Blanc et al., 1979; Hicks et al., 1979; Kielland-Brandt et al., 1979; Struhl et al., 1979; Toh-E et al., 1980; Singh et al., 1982) haben Vorzüge gegenüber anderen Transformationssystemen, die Plasmide mit chromosomalen Hefereplikons (Hsiao & Carbon, 1979 und

1981; Kingsman et al., 1979; Struhl et al., 1979) oder chromosomale Integration (Hinnen et al., 1978; Orr-Weaver et al., 1981) verwenden. Die Vorteile der 2µm-Vektoren sind hohe Transformationseffizienz, hohe Kopienzahl und relativ gute Stabilität der Transformanten (Erhart, 1983). Auf diese Weise wurde in S. cerevisiae die Expression mehrerer pro- und eukaryontischer Gene nachgewiesen (Hollenberg, 1979; Cohen et al., 1980; Mercereau-Puijalon et al., 1980; Beggs et al., 1980; Hitzeman et al., 1981; Janowicz et al., 1983).

Als mit dieser Arbeit begonnen wurde, waren in Minizellen exprimierte Proteine (Hollenberg, 1978) die einzigen Hinweise auf Expression der 2µm-DNA. Da die Transkription einer DNA Grundlage für die Expression ihrer genetischen Information ist, steht sie an erster Stelle des Interesses. Es wird deshalb in dieser Arbeit näher untersucht, (1) ob die bekannten Leserahmen der 2µm-DNA in Hefe alle transkribiert werden und welche RNA-Mengen dabei in der Zelle auftreten, (2) ob durch gespleißte RNAs Hinweise auf mögliche weitere Genprodukte erhalten werden können, und (3) ob es Hinweise auf die Hypothese von Broach et al. (1979) zur Prozessierung eines Primärtranskripts und eine Genregulation durch Inversion gibt.

Antworten auf die ersten beiden Fragen sind von einer genaueren Transkriptionskarte zu erwarten. Für die Untersuchung der dritten Frage bieten sich zusätzlich flp-Rekombinantplasmide an, die in cir°-Hefestämmen nicht invertiert werden. Die RNAs aus solchen Hefestämmen sind von einer definierten Form 14 oder 23 des Plasmids transkribiert worden. Der Vergleich der Transkripte aus Stämmen mit unterschiedlichen Formen des gleichen Plasmids sollte zeigen, ob die Inversion eines Segments der 2µm-DNA ihre Transkription beeinflußt. Deshalb ist die Untersuchung der Transkripte von Derivaten der 2µm-DNA ein wesentlicher

Teil dieser Arbeit. Als einfachstes Derivat der 2µm-DNA wird die 2µmLEU2-DNA untersucht und eine Transkriptionskarte aufgestellt. Weiter wird die RNA von flp-Rekombinantplasmiden untersucht, die sich als Derivate der 2µmLEU2-DNA ansehen lassen und eine höhere Komplexität besitzen. Bei der Untersuchung der Transkription von Derivaten der 2µm-DNA sollte es auch möglich sein, Einflüsse der insertierten Stücke chromosomaler Hefe-DNA und bakterieller Plasmid-DNA auf die Transkription der 2µm-DNA zu untersuchen.
Neben diesen Studien zur Transkription wird in dieser Arbeit auch die funktionelle Expression des FLP-Rekombinationssystems in E.coli beschrieben und näher untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Stämme und Medien

Saccharomyces cerevisiae H1: eine Adenin-bedürftige Mutante von Hansen CBS4593, a.
S. cerevisiae AH22: cir^+, leu2-3, leu2-112, his4-519, can1 (Hinnen et al., 1978).
S. cerevisiae YT6-2-1L: cir°-Derivat von AH22 von C.P.Hollenberg.
S. cerevisiae YT6001: cir°-Derivat von AH22 mit 2µmLEU2-DNA (Erhart, 1983).
Escherichia coli JA221: recA1, leuB6, trpΔE5, $hsdR^-$, $hsdM^+$, lacY, C600 von J. Carbon.
E. coli 490: recA1, rk^-, met^-, thr^-, lacY von G. Hobom.
E. coli 3300: Hfr von R. Herrmann.

Vollmedium für Hefe (YEPD): 1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 0,5% Glucose.
Minimalmedium für Hefe (YNB): 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, 2% Glucose, 0,4% Na-Lactat; Aminosäuren und Basen zur Endkonzentration 20µg/ml nach dem Autoklavieren zugeben.
Vollmedium für E. coli (L-Broth): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,1% Glucose.
Minimalmedium für E.coli (M9): 0,2% Glucose, 0,6% Na_2HPO_4, 0,3% KH_2PO_4, 0,05% NaCl, 0,1% NH_4Cl; nach dem Autoklavieren pro Liter steril zugeben: 0,1ml 1M $CaCl_2$, 1ml 1M $MgSO_4$, 0,1ml Thiamin (10mg/ml) und Aminosäuren zur Endkonzentration von 20µg/ml.
Antibiotika-Endkonzentrationen: Penicillin G - 150µg/ml; Tetrazyclin - 10µg/ml; Chloramphenicol - 30µg/ml; Kanamycin - 20µg/ml.
Für Nährböden werden 1,8% Agar zugegeben.

2.2 Plasmide

pBR325: bakterielles Plasmid mit dem ColE1-Replikon und den Amp^R-, Cam^R- und Tet^R-Genen (s. Abb.15, S.64) (Bolivar, 1978)

pKB4102: das 2,2kb große SalI-XhoI-Fragment mit dem LEU2-Gen von Hefe integriert in pBR322 (Bolivar et al., 1977) von K. Breunig.

fd109: bakterieller Vektor abgeleitet vom einzelsträngigen Phagen fd, enthält ein Amp^R-Gen (Herrmann et al., (1980).

BTYP-1: Rekombinantplasmid aus 2µm-DNA (Typ 14), über die PstI-Schnittstelle in das bakterielle Plasmid pBR322 (Bolivar et al., 1977) integriert (Hollenberg, 1980).

pK21: Rekombinantplasmid aus 2µm-DNA (14) und dem bakteriellen Plasmid pACYC177 (Chang & Cohen, 1978). Die 2µm-DNA ist darin über eine BamHI-Stelle integriert, die durch einen Linker in ihre HpaI-Stelle eingeführt wurde (Abb.23, S.83) (Reipen, 1982).

pJDB219: Rekombinantplasmid aus 2µm-DNA (14), die ein 1,25kb-Fragment des LEU2-Gens von Hefe enthält (Allel leu2-d; Erhart, 1983), und dem bakteriellen Plasmid pMB9 (Rodriguez et al., 1976). Die 2µm-DNA ist über die EcoRI-Stelle im S-Segment in die EcoRI-Stelle von pMB9 integriert (Beggs, 1978).

pL610: Rekombinantplasmid, in dem 2µm-DNA (23) mit dem LEU2-Fragment (s.o.) über die EcoRI-Stelle im S-Segment in die EcoRI-Stelle von pBR325 integriert ist (Erhart, 1983).

pL616: Rekombinantplasmid wie pL610, aber Typ 14 der 2µm-DNA (Erhart, 1983)

BTYH2-BTYH5: Rekombinantplasmide aus dem bakteriellen Plasmid pBR313 (Bolivar et al., 1977), in dessen HindIII-Stelle die HindIII-Fragmente 2 bis 5 der 2µm-DNA integriert sind (Hollenberg, 1978).

2.3 RNA-Präparation aus Hefe

Hefekulturen werden in der frühen bis mittleren exponentiellen Wachstumsphase mit Cycloheximid (0,1mg/ml Endkonzentration) gestoppt und 10min. bei 30°C weiterinkubiert, dann abzentrifugiert, gewaschen und mit 1 Teil (Hefefeuchtgewicht = 1) 2xSSC (0,3M NaCl, 30mM Na-Citrat) und 5-10 Teilen Glasperlen (Ø 0,2mm) im Braun-Homogenisator (Stufe 1) etwa 45sec. aufgeschlossen. Bis hierher wird in Eis gearbeitet. Man gibt sofort danach 2 Teile einer Lösung von 4% SDS, 2% 4-Amino-2hydroxybenzoesäure, Na-Salz, 1% tri-Isopropylnaphthalinsulfonat und 6% 2-Butanol (Van Ommen et al., 1979) zu, mischt und gibt dann nach Bedarf 2xSSC zu und schließlich wassergesättigtes Phenol zur Hälfte des Endvolumens. Die gut gemischte Suspension wird abzentrifugiert (10min., 10000rpm) und der Überstand noch 2 bis 3mal mit einem Volumen Phenol für jeweils ca. 10min. extrahiert. Nach dem Waschen mit Chloroform/iso-Amylalkohol (25:1) wird mit 2 Vol. Ethanol bei -20°C präzipitiert.Die gefällten Nukleinsäuren werden in 10mM Tris-HCl (pH7,4), 1mM EDTA, 0,1% Sarkosyl gelöst.

2.4 Polysomen-Präparation

Hefeanzucht und -aufschluß wie oben beschrieben. Sofort nach dem Aufschluß mit 2xSSC verdünnen und abzentrifugieren (12min., 12000rpm, 2°C). Vom Überstand werden ca. 100 bis 150A260 auf einen Sucrose-Gradient (15-40% über 70%-Kissen) in Polyallomer-Röhrchen des Rotors SW28 (Beckman) geladen und 3,5h bei 28000rpm, 4°C zentrifugiert. Die Fraktionierung der Gradienten erfolgt am Durchflußphotometer (Isco; Meßwellenlänge 254nm, Pumpgeschwindigkeit 3ml/min., Fraktionsvolumen 1,2ml). Die Fraktionen mit Polysomen (Abb.11)werden gemeinsam wie oben beschrieben mit Phenol extrahiert und gefällt.

2.5 oligo(dT)-Säule (Aviv & Leder, 1972)

Zur Affinitätschromatographie werden oligo(dT)-Cellulose-(T3, Collaborative Research) oder oligo(dT)-Sephadex-Säulen (BRL) verwendet. Die Nukleinsäure-Lösung wird auf 0,5M NaCl eingestellt, auf die Säule aufgetragen und mindestens mit dem 10fachen Säulenvolumen nachgewaschen (10mM Tris-HCl,(pH7,4),0,5M NaCl, 1mM EDTA, 0,1% Sarkosyl) und mit dem gleichen Puffer ohne NaCl eluiert. Die Fraktionen des Eluats mit Absorption bei 260nm werden vereinigt, gefällt mit Ethanol (s.o.) und in TE-Puffer (10mM Tris-HCl (pH7,4), 0,1mM EDTA) zu einer Endkonzentration von etwa 1,5 bis 3mg RNA/ml in TE-Puffer aufgenommen.

2.6 "Northern"-Technik

Die RNA-Proben (10-20µg RNA von H1 oder 2-8µg RNA der anderen Stämme) werden nach McMaster und Carmichael (1977) 1h bei 50°C in 10mM Na-Phosphat-Puffer (pH7,0), 50% DMSO und 1M Glyoxal denaturiert und dann sofort auf ein 1,5%iges Agarose-Gel (Seakem ME) (Format 12,5 x 25cm) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 50V, 4°C für etwa 15-20h, bis eine parallel aufgetragene Bromphenolblau-Bande am Ende des Gels angelangt ist. Parallel zur RNA werden genauso denaturierte DNA-Proben (Marker) mit 50ng BYTP-1 (s. Abb.13) mitlaufen lassen, die mit HaeIII, HinfI, AvaII oder EcoRI+XbaI geschnitten sind.
Die Nukleinsäure-Banden werden beim Durchsaugen von 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat in einer Anordnung nach Southern (1975) auf Nitrozellulose-Filter (Schleicher & Schüll) transferiert (Thomas, 1980), 2h bei 80°C gebacken und dann für die Hybridisierung vorinkubiert. Dafür werden die Filter 3-10h bei 37°C in 50% Formamid, 0,75M NaCl, 75mM Na-Citrat, 25mM Na-Phosphat (pH7,0), jeweils 0,02% (w/v) Ficoll, Polyvinylpyrrolidon und BSA, DNA (1mg/ml)

und 0,5% Sarkosyl leicht geschüttelt. Die Hybridisierung mit der radioaktiven DNA-Probe erfolgt 15-20h mit 1-3x10^7cpm ^{32}P-DNA (0,5-1x10^8cpm/µg DNA) unter den gleichen Bedingungen wie die Vorinkubation. Die DNA-Probe ist durch "Nick-translation" mit ^{32}P-dATP radioaktiv markiert. Nach der Hybridisierung wird 3mal mit 50% Formamid, 0,75M NaCl und 75mM Na-Citrat bei 37°C gewaschen, mit 0,15M NaCl, 15mM Na-Citrat nachgewaschen und mit Röntgenfilm (X-Omat, Kodak) und Verstärkerfolie (QuantaIII, DuPont) 5h bis 5 Tage bei -70°C exponiert. Für die exakte Zuordnung einzelner Banden werden einzelne "Northern"-Filter nachhybridisiert. Dazu wird die erste Hybridisierungsprobe durch Inkubation der Filter bei 85-90°C in 5mM Tris-HCl (pH8,0), 0,025% Na-Pyrophosphat, 0,2mM EDTA abgewaschen. Nach erneuter Vorinkubation (s.o.) wird wie oben beschrieben mit einer anderen ^{32}P-markierten DNA hybridisiert.

2.7 "Northern" mit einzelsträngiger fd-DNA

Bei dieser Methode wird wie unter 2.5 beschrieben vorgegangen bis zur Vorinkubation der Nitrozellulose-Filter. Danach wird mit ca. 1µg einzelsträngiger DNA von rekombinanten fd-Phagen hybridisiert wie bei der "Northern"-Technik üblich. Dann wird gewaschen unter Hybridisierungsbedingungen und alle Filter mit unterschiedlichen Einzelstrangproben gemeinsam mit 0,5µg ^{32}P-markierter doppelsträngiger DNA des Vektors fd109 erneut hybridisiert. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Radioaktivität werden die Filter mit Röntgenfilm exponiert.

2.8 S1-Kartierung der Transkripte (modifiziert nach Berk & Sharp, 1977)

Etwa 20µg poly(A)-RNA wird mit 4µg einzelsträngiger DNA der rekombinanten fd-Phagen in 50% Formamid, 20mM PIPES (pH 6,5), 0,6M NaCl, 1mM EDTA, 0,2% SDS in einem Volumen

von 25µl in 100µl-Einmal-Glaspipetten eingeschmolzen. Nach 5min. Inkubation im 70°C-Wasserbad wird dieses rasch auf 55°C und dann langsam auf 37°C abgekühlt. Nach 5h bei 37°C werden die Proben mit 270µl eiskaltem S1-Puffer (30mM Na-Acetat, (pH6,5),0,25M NaCl, 1mM $ZnSO_4$, denaturierte DNA (20µg/ml)) schnell gemischt und mit 600U S1-Nuklease (Boehringer Mannheim) 40min. bei 37°C abgebaut. Nach dem Neutralisieren mit 30µl 1M Tris-HCl (pH8,0) wird mit Phenol und Chloroform/iso-Amylalkohol extrahiert und nach Zugabe von 10µg tRNA mit 0,75ml Ethanol gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren werden im DMSO/Glyoxal-Gemisch (s. 2.5) gelöst und wie unter 2.5 beschrieben durch Elektrophorese aufgetrennt und durch Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 2µm-DNA nachgewiesen. Zur Kontrolle werden Proben ohne fd-DNA, ohne H1-RNA und ohne S1-Abbau parallel mituntersucht.

2.9 Analyse von DNA nach Southern (1975)

Die mit Restriktionsenzymen nach Vorschrift gespaltene DNA (ca. 0,1µg) wird auf einem 0,7% Agarose-Gel in Gelpuffer 36mM Tris, 30mM Na-Phosphat, 1mM EDTA (pH 7,8), Ethidiumbromid (0,1µg/ml) über Nacht bei 30-50V aufgetrennt und im UV-Licht photographiert. Zur Denaturierung der DNA wird das Gel 45min. bei Raumtemperatur in 0,5M NaOH, 1,5M NaCl leicht geschüttelt, 1h in 0,5M Tris-HCl (pH7,0), 3M NaCl neutralisiert und dann durch Durchsaugen von 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat die DNA auf ein Nitrozellulose-Filter transferiert.
Nach dem Waschen in 0,3M NaCl, 30mM Na-Citrat wird das Filter 2h bei 80°C gebacken. Danach wird vorinkubiert, hybridisiert, gewaschen und exponiert wie bei der "Northern"-Technik beschrieben.

2.10 Herstellung der DNA-Proben zur Hybridisierung und "Nick-Translation"

5-15µg DNA der Plasmide BTYH2 bis -5 bzw. BTYP-1 werden mit den Restriktionsenzymen HindIII bzw. HaeIII, HinfI, PvuII, TaqI und HpaI+TaqI wie von den Herstellern vorgeschrieben geschnitten. Die DNA-Fragmente werden in 0,7-1% Agarose-Gelen in Gelpuffer (s. 2.8) aufgetrennt, im UV-Licht sichtbar gemacht und in Chromatographie-Papier DE81 (Whatman) hineinelektrophoresiert. Die Elution erfolgt nach Dretzen et al. (1981) während 15h in 20mM Tris-HCl (pH7,5), 1,9M NaCl und 1mM EDTA bei 37°C. 0,2-0,5µg der Ethanol-gefällten und in TE-Puffer gelösten DNA werden "nick-translatiert" (Rigby et al., 1977). Die Reaktion läuft 1h ab bei 15°C in 25µl Volumen mit 20µCi α-^{32}P-dATP, je 2µl 0,1mM dCTP, dGTP und dTTP, 1µl DNA-Polymerase I (Boehringer, Mannheim) in 50mM Tris-HCl (pH7,8), 5mM $MgCl_2$, 10mM ß-Mercaptoethanol und BSA (50µg/ml). Die Mononukleotide werden durch Gelfiltration (Sephadex G50 in TE-Puffer) abgetrennt.

2.11 Hefe-Transformation (Beggs, 1978)

Zellen aus 0,1l Vollmedium werden in der exponentiellen Phase geerntet, gewaschen und in DTT-Lösung (1,2M Sorbit, 25mM EDTA, pH8,0, 50mM DTT) aufgenommen. Nach 15min. Inkubation bei 30°C werden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit 1,2M Sorbit gewaschen und in Helicase-Puffer (1,2M Sorbit, 10mM EDTA, 0,1M Na-Citrat (pH5,8) Helicase (1mg/ml) (L'Industrie Biologique Francaise, Clichy)) aufgenommen und bei 30°C leicht geschüttelt. Das Ende der Helicase-Behandlung wird durch das Aufklaren einer 50µl-Probe der Zellsuspension in 1ml H_2O festgestellt. Die Protoplasten werden abzentrifugiert, zweimal mit 1,2M Sorbit und zum Schluß mit 1,2M Sorbit, 10mM $CaCl_2$ gewaschen und in 100µl dieser Lösung aufgenommen.

Jeweils 50µl dieser Protoplastensuspension werden mit ca. 5µg Plasmid-DNA 15min. bei Raumtemperatur inkubiert, mit 0,5ml PEG-Lösung (20% Polyethylenglykol 4000, 10mM Tris-HCl (pH7,5), 10mM $CaCl_2$) versetzt und weitere 20min. wie oben inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren werden die Zellen in 100µl 1,2M Sorbit, 10mM $CaCl_2$ aufgenommen und nach Zugabe von 50µl YEPD, 1,2M Sorbit 30min. bei 30°C leicht geschüttelt, wieder abzentrifugiert und nach dem Waschen mit 1,2M Sorbit in 2ml 1,2M Sorbit suspendiert. Dnvon werden 5-100µl ausplattiert. Dazu mischt man ein Aliquot der Suspension mit 5ml Top-Agar (YNB-Medium mit 1,2M Sorbit und 3% Agar) von etwa 45°C und gießt auf YNB-Platten mit 1,2M Sorbit aus. Nach 2 bis 4 Tagen Inkubation bei 30°C sind die Kolonien zu sehen.

2.12 DNA aus Hefe-Minilysaten (Struhl et al., 1979)

Hefezellen aus einer 5ml-Kultur in Minimalmedium werden in der exponentiellen Phase abzentrifugiert, zweimal gewaschen und in 0,8ml Sphäroplastenpuffer (1,2M Sorbit, 50mM K-Phosphat-Puffer (pH7,5), 14mM ß-Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach Zugabe von 50µl Zymolyase-Lösung (10mg/ml in 50% Glycerin; Zymolyase 5000 von Kirin Brewery, Japan) wird die Suspension 30-60min. bei 30°C inkubiert. Die Protoplasten werden abzentrifugiert, in 0,5ml 50mM EDTA (pH8,5) aufgenommen und durch Zugabe von 20µl SDS-Lösung (10%) lysiert und 20min. auf 65°C erhitzt. Das Lysat wird in Eis abgekühlt, mit 0,1ml 5M K-Acetat versetzt und nach 1h in Eis 10min. bei 12000rpm (JA20, Beckman) abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wird mit 0,3ml Ethanol einige Stunden in Eis gefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird die DNA in 100µl TE-Puffer gelöst und für jede Probe 2-5µl eingesetzt. Die Analyse dieser Minilysat-DNA erfolgt nach Spaltung mit Restriktionsenzymen durch Hybridisierung nach Southern (1975).

2.13 Transformation von E.coli (Mandel & Higa, 1970)

20ml einer E.coli-Kultur der Dichte 0,5 A_{600} werden abzentrifugiert, in 5ml 0,1M $CaCl_2$ aufgenommen und 20min. in Eis stehenlassen. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Zellen in 1ml 0,1M $CaCl_2$ suspendiert. Zu 0,1ml-Portionen davon wird etwa 0,1µg Plasmid-DNA oder Ligationsgemisch mit 2-5µg DNA zugegeben. Nach 30min in Eis und 5min. im 37°C-Wasserbad werden die Zellen mit 2ml Vollmedium 45-90min. bei 37°C geschüttelt. Von dieser Kultur werden 3-100µl ausplattiert. Dies ist entweder auf Vollmedium-Platten mit Antibiotika möglich oder auf Minimalmedium-Platten nach dem Waschen der Zellen mit 10mM NaCl.

2.14 Minilysate von E.coli (modifiziert nach Clewell & Helinski, 1969)

1ml einer stationären E.coli-Kultur in Vollmedium mit Antibiotikum wird abzentrifugiert, in 50mM Tris-HCl (pH8,0), 25% Sucrose gewaschen und in 1ml dieser Tris/Sucrose-Lösung wieder aufgenommen. Mit 0,2ml Lysozym (5mg/ml in Tris/Sucrose, s.o.) und 50µl 0,5M EDTA werden die Zellen 30min. in Eis gehalten und durch Zugabe von 0,5ml Triton-Mix (0,15M Tris-HCl (pH8,0), 0,3% Triton X-100, 190M EDTA) lysiert. Nach intensiver Zentrifugation (40min. bei 15000rpm in JA20, 4°C) wird der Überstand mit 1ml H_2O verdünnt, einmal mit wassergesättigtem Phenol extrahiert und mit Chloroform/iso-Amylalkohol (25:1) gereinigt. Nach Fällung der DNA mit Ethanol (einige Stunden bei -20°C) wird sie in 50µl TE-Puffer gelöst und durch Gelelektrophorese analysiert. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid reichen 5µl aus.

2.15 Minilysate von E.coli (Holmes & Quigley, 1981)

1ml einer stationären E.coli-Kultur in Vollmedium wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert. Die Zellen werden in STET (50mM Tris-HCl (pH7,5), 5% Triton X-100, 8% Sucrose, 50mM EDTA) suspendiert und nach Zugabe von 40µl Lysozym (10mg/ml) für 50-60sec. im kochenden Wasserbad aufgebrochen. Das Lysat wird in Eis abgekühlt und 10min. bei 4°C in der Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nachdem der Niederschlag aus der Probe entfernt ist, läßt sich die Plasmid-DNA mit 0,3ml iso-Propanol in 10min. bei -20°C fällen. Nach 3min. Abzentrifugieren wird die DNA in 0,4ml TE-Puffer aufgenommen und mit 24µl 5M NaCl versetzt. Die Fällung wird wie oben wiederholt, mit 80% Ethanol nachgewaschen und die DNA getrocknet. 15µl der in 50µl TE-Puffer gelösten DNA reichen für die Analyse im Gel durch Anfärben mit Ethidiumbromid.

2.16 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Clewell & Helinski, 1969)

300ml einer stationären E.coli-Kultur, gegebenenfalls mit Chloramphenicol (150µg/ml) amplifiziert, werden wie unter 2.13 beschrieben aufgearbeitet. Nach dem Waschen und Aufnehmen in 50ml Tris-Sucrose (s.2.13) werden die Zellen mit 10ml Lysozym, 2,5ml EDTA in Eis inkubiert, durch 25ml Triton-Mix lysiert und wie oben angegeben abzentrifugiert. Der Überstand wird mit Phenol extrahiert, gefällt und in 14ml TE-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 14g CsCl und 1,4ml Ethidiumbromid (10mg/ml) wird eine Gleichgewichtszentrifugation für 12h im Vertikalrotor VTi50 (Beckman) bei 44000rpm (20°C) durchgeführt. Die Plasmidbande wird durch UV-Licht sichtbar gemacht, aus dem Gradienten entnommen und gegebenenfalls nochmals im VTi65-Rotor zentrifugiert. Die DNA-Lösung wird mit iso-Amyl-

alkohol mehrfach extrahiert bis kein Ethidiumbromid mehr enthalten ist. Nach dem Fällen der DNA wird sie in TE-Puffer aufgenommen.

2.17 Konstruktion von Rekombinantplasmiden

Die gereinigte Plasmid-DNA wird mit dem Restriktionsenzym nach Vorschrift des Herstellers geschnitten, die Reaktion durch 10min. Erhitzen auf 65°C oder eine Phenolextraktion gestoppt und ein Aliquot auf einem Agarose-Gel getestet. Die isolierten Fragmente oder das Fragmentgemisch wird zusammengegeben und ligiert. Dazu werden insgesamt 1µg DNA in 50mM Tris-HCl (pH7,5), 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 5mM DTT, 3mM ATP in einem Volumen von 25µl mit 0,1U T4-Ligase (Boehringer Manmheim) über Nacht bei 15°C inkubiert (nach Weiss et al., 1968).
Für die Konstruktion der pGTT-Plasmide wird die Schnittstelle mit DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) aufgefüllt. Dazu wird die geschnittene DNA im Reaktionsansatz wie für die "Nick-Translation" (s. 2.9), jedoch mit 2U Klenow-Fragment (Boehringer Mannheim) für 30min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Doppelstrang-Enden der DNA-Moleküle werden mit SalI-Linkern in 20fachem molarem Überschuß wie oben angegeben ligiert.

2.18 Konstruktion von rekombinanten fd-Phagen

Zellen des E.coli-Stamms 490 werden mit doppelsträngiger DNA des Phagenvektors fd109 (Herrmann et al., 1980) transformiert wie in 2.12 beschrieben. Die Zellsuspension wird anschließend mit 0,1ml einer Kultur E.coli 3300 (Hfr) der Zelldichte $2x10^9$-Zellen/ml in Oberschicht-Agar (1% Agar) ausplattiert. Nach 15-20h Inkubation werden die Transformanten aus den schwach sichtbaren Plaques auf Penicillin-Platten überführt. Die Isolierung der doppelsträngigen Phage-DNA erfolgt wie unter 2.15 beschrieben.

Die HindIII-geschnittene DNA von fd109 wird zusammen mit den HindIII-Fragmenten aus den BTYH-Plasmiden (Hollenberg, 1978) ligiert. Das Ligationsgemisch wird in E.coli 490 transformiert und wie oben beschrieben ausplattiert. Mit zunehmender Größe der insertierten Fragmente werden die Plaques immer schlechter sichtbar. Die Transformanten mit 2µm-Fragmenten werden durch Plaque-Hybridisierung identifiziert.

2.19 Plaque-Hybridisierung nach Benton und Davis (1977)

Auf den Oberschicht-Agar der Platten mit deutlich sichtbaren Phagen-Plaques werden vorgewaschene, sterile Nitrozellulosefilter aufgelegt, und bei Raumtemperatur läßt man die Phagen ca. 1/2h adsorbieren. Nach dem Abnehmen der Filter werden sie etwa 30sec. in 0,1N NaOH, 1,5M NaCl denaturiert und in 0,2M Tris-HCl (pH7,5), 0,3M NaCl, 30mM Na-Citrat, 25mM Na-Phosphat, 2mM EDTA neutralisiert und 2h bei 80°C gebacken. Danach werden sie wie bei 2.5 beschrieben vorinkubiert, hybridisiert und exponiert (s. Abb.6).

2.20 Bestimmung der relativen Orientierung der 2µm-Fragmente in den rekombinanten fd-Phagen (Herrmann et al., 1980)

Entsprechend 2.21 werden Phagen in kleinem Maßstab aus 3ml-Kulturen (Vollmedium mit Penicillin) isoliert. Die Phagen werden in 50µl 50mM Tris-HCl (pH8,0), 0,2M NaCl, 1% SDS suspendiert, jeweils 5µl von zwei zu testenden Präparationen zusammen in 50µl-Einmal-Glaspipetten eingeschmolzen und 1min. im 100°C-Wasserbad lysiert. Nach dem Transfer der Proben in ein 80°C-Wasserbad läßt man dieses über Nacht auf Raumtemperatur abkühlen. Die Phagen-DNA wird anschließend im 1%-Agarose-Gel in Gelpuffer (s. 2.8) bei 30V aufgetrennt und im UV-Licht photographiert (s. Abb.6).

2.21 Bestimmung der absoluten Orientierung der 2µm-Fragmente in den rekombinanten fd-Phagen

Die nach 2.15 isolierte doppelsträngige DNA der Phagen wird mit kleinschneidenden Restriktionsenzymen (z.B. HinfI, HindIII, TaqI und AvaII) gespalten und in 7,5% Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb.6). Da alle Teile der rekombinanten Phagen (fd-Phage, pBR322-Teil und 2µm-Fragmente) sequenziert sind, ist eine Kartierung der Schnittstellen in den 2µm-Fragmenten relativ zum Phagen sehr einfach möglich.

2.22 Isolierung von fd-Phagen (Herrmann et al., 1980)

0,5l Vollmedium werden mit E.coli 3300 (Hfr) angeimpft, zu einer Dichte von etwa $0,5A_{600}$ wachsen lassen und dann mit etwa $2x10^9$ Phagen infiziert (Multiplizität ca. 0,05). 15min. nach der Infektion mit Phagen wird Penicillin G zu einer Endkonzentration von 150µg/ml zugegeben und weitere 12h unter starkem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden 15min. bei 8000rpm (JA10) abzentrifugiert und können zur Isolierung doppelsträngiger Phagen-DNA nach 2.15 verwendet werden. Nach nochmaligem Zentrifugieren wie oben zur vollständigen Abtrennung der Bakterienzellen werden die Phagen im Überstand durch Einstellen des Mediums auf 3% Polyethylenglykol 6000 und 0,5M NaCl über Nacht bei 4°C gefällt. Nach dem Abzentrifugieren (15min., 8000rpm, JA10) werden die Phagen in 100ml TE-Puffer aufgenommen und mit 2% Polyethylenglykol, 0,5M NaCl wie oben gefällt. Aus diesen Präparationen werden $5-10x10^{14}$ Phagen erhalten.

2.23 Isolierung von einzelsträngiger Phagen-DNA (Herrmann et al., 1980)

Die Phagensuspensionen aus 2.21 werden mit einem Volumen Phenol (gesättigt mit TE-Puffer) ca. 15min. im 60°C-Wasserbad gut gemischt und nach dem Abkühlen 10min. bei 10000rpm (JS-13) abzentrifugiert. Die obere Phase wird nochmals extrahiert, nach dem Abkühlen mit einem Volumen Chloroform/iso-Amylalkohol (25:1) versetzt und wie oben abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wird mit Ethanol und NaCl gefällt. Diese Präparationen einzelsträngiger Phagen-DNA werden durch Analyse nach Southern (1975) (s. 2.8) auf Abwesenheit von Spuren doppelsträngiger DNA untersucht (Abb.6).

2.24 in vitro-Test auf FLP-Aktivität in E.coli (nach Potter & Dressler, 1978)

Stationäre 0,3l-Kulturen von E.coli-Stämmen mit einem FLP-Rekombinantplasmid werden abzentrifugiert, die Zellen in 2,5ml 50mM K-Phosphat-Puffer (pH7,4), 10% Sucrose aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach langsamem Auftauen auf Eis wird 0,5ml Lysozymlösung (1mg/ml in 50mM K-Phosphat-Puffer) zugegeben, erneut eingefroren und aufgetaut wie oben. Das zähflüssige Lysat wird 40min. bei 18000rpm (57000xg) im SW40-Rotor (Beckman) abzentrifugiert und vom Überstand durch Gelfiltration über eine Sephadex G25-Säule (in 0,1M Tris-HCl (pH7,5), 50mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM ß-Mercaptoethanol) die makromolekulare Fraktion isoliert. Diese Methode zur Gewinnung eines hochkonzentrierten Zell-Lysats wird verschiedentlich abgeändert. So wird auch die Lyse in dem gleichen Puffer wie für die Säule beschrieben durchgeführt, das Lysat bei 320 000xg abzentrifugiert und auch die Gelfiltration weggelassen. Diese Änderungen haben jedoch keinen erkennbaren Einfluß auf das Endergebnis.

Die erste Säulenfraktion mit Absorption bei 280nm wird für den Test auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: Lysat 5-20A_{280}/ml, Testplasmid (BTYP-1) 80µg/ml, dATP, dCTP, dGTP und dTTP jeweils 0,1mM, ATP 4mM, CTP, GTP und UTP jeweils 0,2mM, NAD^+, $NADP^+$ und NADPH jeweils 1mM, Phosphoenolpyruvat 2mM und Spermidin 5mM in 0,1M Tris-HCl (pH7,5), oder 150mM K-Phosphat (pH7,8) und jeweils 50mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 6mM ß-Mercaptoethanol. Die Testansätze werden 20min. bis 18h bei 37°C inkubiert. Danach wird zweimal mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Ansätze mit K-Phosphat werden vor der Fällung über eine kleine Sephadex G50-Säule entsalzt. Die gefällte DNA wird mit dreifachem Überschuß an EcoRI-Enzym geschnitten und nach Southern (1975) analysiert.

2.25 Abkürzungen

A: Adenosin-Rest in DNA- oder RNA-Sequenz; Amp: Ampicillin; ATP: Adenosin-5'-triphosphat; b: Basen (als Längenangabe bei RNA); bp: Basenpaare (als Längenangabe bei DNA); BSA: Rinderserumalbumin; C: Cytidinrest in DNA- oder RNA-Sequenz; Cam: Chloramphenicol; cir^+, cir^0: Anwesenheit bzw. Abwesenheit endogener 2µm-DNA in Hefestämmen; cpm: Impulse pro Minute; CTP: Cytidin-5'-triphosphat; dATP: Desoxyadenosin-5'-triphosphat; DBM: m-Diazobenzyloxymethyl-Rest; dCTP: Desoxycytidin-5'-triphosphat; dGTP: Desoxyguanosin-5'-triphosphat; DMSO: Dimethylsulfoxid; DNA: Desoxyribonukleinsäure; DNAase: Desoxyribonuklease; DTT: DL-Dithiothreitol; dTTP: Desoxythymidin-5'-triphosphat; EDTA: Äthylen-dinitriloessigsäure, Na-Salz; FLP: Gen der 2µm-DNA, das für ihre Interkonversion verantwortlich ist; G: Guanosin-Rest in DNA- oder RNA-Sequenz; GTP: Guanosin-5'-triphosphat; Kan: Kanamycin; kb: Kilobasen(-paare) (als Längenangabe bei DNA oder RNA); LEU2: Hefegen für ß-Isopropylmalat-Dehydrogenase; NAD^+: ß-Nicotinamid-adenindinucleotid; NADH: ß-Nicotinamid-

adenindinucleotid, reduziert; $NADP^+$: ß-Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat; NT: Nukleotidpaare (zur Angabe einer Stelle auf der DNA-Sequenz); RNA: Ribonukleinsäure; RNAase: Ribonuklease; rpm: Umdrehungen pro Minute; rRNA: ribosomale RNA; SDS: Na-Dodecylsulfat; T: Thymidin-Rest in DNA-Sequenz; Tet: Tetracyclin; Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; rRNA: transfer-RNA; U: Uridin-Rest in RNA-Sequenz; UTP: Uridin-5'-triphosphat.

3 Ergebnisse Transkription

3.1 Untersuchung der in vivo-Transkription endogener 2µm-DNA und 2µmLEU2-DNA

Die 2µm-DNA ist 6318bp lang und enthält drei größere Leserahmen, die zusammengenommen 3273bp umfassen (Hartley & Donelson, 1980). Da die publizierten Daten zur Expression von Genen auf der 2µm-DNA kein einheitliches Bild ergaben (Guerineau, 1977; Gubbins et al., 1977, Hollenberg, 1978; Broach et al., 1979; Preibisch, 1979), sollte untersucht werden, ob diese Leserahmen von der Zelle transkribiert werden und zur Synthese von Proteinen dienen können, ob es weitere Informationen auf der 2µm-DNA gibt, die als RNA von der Zelle genutzt werden und wie viel von diesen Transkripten in der Hefezelle vorkommt. Dazu mußten die Transkriptionsprodukte der 2µm-DNA näher charakterisiert werden.

Aus aerob wachsenden Zellen vom Stamm H1 wurde in der frühen bis mittleren exponentiellen Wachstumsphase RNA isoliert. Die Affinitätschromatographie an einer oligo-(dT)-Säule trennte diese RNA nach ihrem poly(A)-Gehalt in zwei Fraktionen auf. Die denaturierten RNAs dieser Fraktionen wurden durch Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe weiter aufgetrennt. Dabei entsteht ein typisches Bandenmuster der RNAs unterschiedlicher Länge. Nach Transfer dieses Musters auf einen Träger ("northern blotting"; Alwine et al., 1977 und 1978; Thomas, 1980) konnten die Transkripte der 2µm-DNA durch Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 2µm-DNA gekennzeichnet und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden ("Northern"-Technik).

3.1.1 Nachweis der Transkripte von 2µm-DNA im Hefestamm H1

Die in vivo-Transkription der 2µm-DNA läßt sich mit Hilfe der beschriebenen "Northern"-Technik nachweisen (Broach et al., 1979; Preibisch, 1979). In der poly(A)-haltigen Fraktion der Hefe-RNA hybridisierten etwa sechs unterscheidbare Banden mit der 2µm-DNA (Abb.3). Dieses Muster war in allen Experimenten gut reproduzierbar. Es besteht

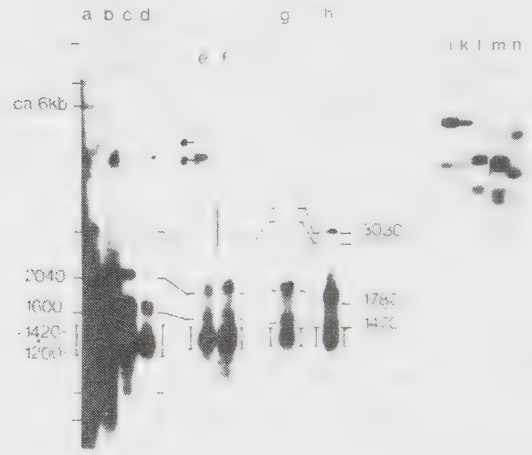


Abb.3: Transkripte der 2µm- und 2µmLEU2-DNA. a-f: poly(A)-RNA aus H1 (2µm-DNA); a,c: Gesamt-poly(A)-RNA; b,d: polysomale poly(A)-RNA (s. 3.5); a,b: überexponiert zur Darstellung der schwachen Banden bei 6-12kb (s. S.28); e: poly(A)-RNA aus H1 mit Spuren 2µm-DNA (Markierungspunkte); f: dasselbe Filter wie e nach DNAase-Behandlung, 10mal länger exponiert; g,h: poly(A)-RNA aus YT6001 (2µmLEU2-DNA) aus verschiedenen Experimenten, unterschiedlich lang exponiert. Die Längen der Haupttranskripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA (unterstrichen) sind in Basen angegeben, schwächere nur durch Striche markiert. i-n: Nachweis der 2µmLEU2-DNA in YT6001 und Test auf Abwesenheit von 2µm-DNA. i,k: Minilysate von YT6001, ungeschnitten; l: wie i, aber EcoRI-geschnitten (4350, 4073, 2680 und 2407b; 820b nicht zu sehen); m: 2µm-DNA, EcoRI-geschnitten (4073, 3857, 2407 und 2245n); n: 2µm-DNA, ungeschnitte. Alle Proben a-n gegen 2µm-DNA hybridisiert, Marker für a-h s. Text.

aus einer dicken Bande mit mehreren relativ häufigen RNAs zwischen etwa 1200 und 1400b, die nicht aufgelöst werden, zwei Banden bei ca. 1600 und 2040b sowie drei weiteren schwächeren Banden. Die Analyse mit verschiedenen Fragmenten der 2µm-DNA als Hybridisierungsproben (s. 3.2) zeigte, daß es sich um elf verschiedene RNA-Spezies handelt, die sich zum Teil im Autoradiogramm gegenseitig verdecken (Tab.1). Die Länge der RNAs wurde durch Vergleich mit denaturierter DNA bestimmt (McMaster & Carmichael, 1977). Dazu wurde DNA von BTYP-1 mit Restriktionsenzymen geschnitten und in der Elektrophorese parallel zur RNA eingesetzt, so daß DNA-Fragmente zwischen 0,3 und 4kb durch Hybridisierung mit ^{32}P-DNA als Längenmarker dienten. Die angegebenen Längen der RNA sind die Mittelwerte aus mehreren Experimenten. Man findet erheblich mehr verschiedene Transkripte der 2µm-DNA als aus den Sequenzdaten zu erwarten war. Zusammengenommen sind sie etwa 17400b lang, entsprechend dem 2,75fachen der Länge der 2µm-DNA. Die Anzahl der Transkripte in der Zelle ist sehr niedrig (s. 3.6). Diese Ergebnisse stimmen gut überein mit den von Broach publizierten (Broach et al., 1979).

2µm-DNA	2µmLEU2-DNA
	3030
2770	2770
2430	2430
2040	
	1780
	1670
1600	
1580	1580
	1470
1420	1420
1320	1320
1280	1280
1190	1190
930	930
700	

Tab.1: Transkripte der 2µm- und 2µmLEU2-DNA, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten. Längenangaben in Basen, die Hauptbanden sind unterstrichen.

Die Transkripte der 2µm-DNA konnten nur in der poly(A)-haltigen Hefe-RNA eindeutig nachgewiesen werden. In dieser RNA-Fraktion war die poly(A)-RNA etwa 30- bis 40fach gegenüber der Gesamt-RNA-Präparation angereichert worden. In der Gesamt-RNA war das Hybridisierungsmuster mit 2µm-DNA als Probe so schwach, daß nur der Bereich der nicht aufgelösten Banden bei etwa 1200-1400b zu sehen war (Preibisch, 1979). In einer groben Abschätzung entspricht das Verhältnis der Intensitäten der Hybridisierung von poly(A)-haltiger zu Gesamt-RNA etwa dem Anreicherungsfaktor durch die Affinitätschromatographie. Die nicht poly(A)-haltige Fraktion der Hefe-RNA ergab keine Hybridisierung (s. 3.1.3 u. Abb.12f). Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb nur die poly(A)-haltige RNA verwendet.

Der AT-Gehalt der 2µm-DNA von 61% ließ vermuten, daß es ähnlich wie in chromosomaler Hefe-DNA längere oligo(dA)-Bereiche gibt, die eventuell Ursache für die Affinität aller RNAs zur oligo(dT)-Säule sein könnten. Als längste Sequenzen dieser Art fand ich jedoch in der 2µm-DNA neben acht $(dA)_6$- nur sechs $(dA)_7$-Sequenzen und eine Sequenz vom Typ $(dA)_5dC(dA)_5$, die wohl zu kurz sind, um für die Anreicherung in Frage zu kommen.

In einigen Präparationen poly(A)-haltiger RNA waren geringe Mengen 2µm-DNA enthalten (Abb.3). Um sicherzustellen, daß keine der als RNA angesehenen Banden von dieser DNA herrührt, wurde in einem Experiment mit starken DNA-Banden eine DNAaseI-Behandlung der am DBM-Papier gebundenen DNA/DNA- und RNA/DNA-Hybride durchgeführt. Dieses Verfahren ist der DNAase-Behandlung vor der Elektrophorese überlegen, weil keine Probleme durch geringste RNAase-Aktivitäten der DNAase auftreten können. Nach der DNAase-Behandlung des hybridisierten DBM-Filters war das typische Bandendublett der 2µm-DNA im Autoradiogramm vollständig

verschwunden (Abb.3). Die Intensität der RNA-Banden wurde etwa auf ein Fünftel abgeschwächt, das Muster blieb unverändert. Die Intensitätsabnahme der RNA-Banden rührt daher, daß die DNAase auch das DNA/DNA-Netzwerk der hybridisierenden ^{32}P-DNA an den RNA-Banden abbaut.

In einigen RNA-Präparationen traten nach Hybridisierung mit 2µm-DNA zusätzlich drei sehr schwache hochmolekulare Banden auf (Abb.3). Ihre Längen konnten nicht bestimmt werden, sie dürften jedoch zwischen 6 und 12kb liegen. Sie wurden anfangs mit den beschriebenen DNA-Banden einer anderen Präparation gleichgesetzt, doch lassen sie sich nicht durch eine erneute Passage über eine oligo(dT)-Säule beseitigen. Ihre Mobilität im Gel ist viel zu gering für die lineare, zirkuläre und superhelikale Form der 2µm-DNA. Eine Untersuchung dieser Banden mit DNAase ist sicher nicht möglich, da sie durch eine Abschwächung auf ein Fünftel nicht mehr nachweisbar wären. Es wird vermutet, daß es sich bei diesen Banden um sehr große Transkripte der 2µm-DNA handelt, die nur in Spuren in den RNA-Präparationen enthalten sind.

3.1.2 Anmerkungen zur Technik

Die einzelnen Transkripte der 2µm-DNA ließen sich in nativer RNA elektrophoretisch nicht voneinander trennen. Sie wanderten alle etwa gleich schnell und ergaben im Autoradiogramm eine einzige breite, kräftige "Bande", die schneller wanderte als die Hauptbande der denaturierten RNA. Die höhere Mobilität der nativen RNAs ist auf intramolekulare Faltung zurückzuführen. Diese "Bande" schmierte in Richtung der längeren RNAs, was gut durch Aggregation erklärt werden kann. Die Verwendung von Nitrozellulose-Filtern als Träger für den RNA-Transfer (Thomas, 1980) erbrachte erhebliche Vorteile gegenüber der vorherigen Methode mit DBM-Papier (Alwine et al., 1977 und 1980). Die höhere Signalintensität einerseits und der schwächere Grauschleier machten

die Methode wesentlich empfindlicher. Bei der Hybridisierung von DMB-Papier waren im Autoradiogramm oft einzelne kleine Flecken aufgetreten, die gelegentlich so gehäuft vorkamen, daß die Auswertung dieser Experimente unmöglich wurde. Bei Nitrozellulose-Filtern findet man keine unspezifisch gebundene Radioaktivität dieser Art. Außerdem ist diese Technik schneller, einfacher und billiger. Im folgenden werden deshalb fast ausschließlich Autoradiogramme von Nitrozellulose-Filtern gezeigt, obwohl viele Ergebnisse auch durch Experimente mit DBM-Papier abgesichert sind.

3.1.3 Transkription der 2µmLEU2-DNA im Hefestamm YT6001

Aus endogener 2µm-DNA und exogenen Plasmiden können in vivo Rekombinantplasmide entstehen, falls die exogenen Plasmide mindestens eine intakte IR-Sequenz der 2µm-DNA tragen. In einigen Fällen entsteht dabei die 2µmLEU2-DNA (Abb.2), die im L-Segment ein Fragment chromosomaler Hefe-DNA mit dem LEU2-Gen enthält (Dobson et al., 1980; Erhart & Hollenberg, 1981). Die Region mit dem Hefe-Fragment stammt ursprünglich aus pJDB219 (Beggs, 1978) und trägt ein Allel des LEU2-Gens, das nur schwach exprimiert aber normal reguliert wird. Es wird leu2-d genannt (Erhart, 1983). Die schwache Expression kommt wohl daher, daß in 5'-Richtung vor der codierenden Sequenz nur noch 29bp des intakten LEU2-Gens erhalten sind (Erhart, 1983). Der untersuchte Hefestamm YT6001 mit 2µmLEU2-DNA wurde abgeleitet von AH22 (cir^+, leu2, his4) und enthält keine endogene 2µm-DNA mehr (Abb.3 l). In den Rekombinantplasmiden wie pJDB219, deren Transkription sich wegen ihrer Komplexität nicht vollständig aufklären ließ (s. 3.7), ist die 2µmLEU2-DNA enthalten. Sie kann daher als einfacheres Modell für die Transkription dieser Plasmide dienen.

Die Transkription der 2µmLEU2-DNA im Hefestamm YT6001 ließ sich leicht nachweisen. Proben mit poly(A)-haltiger RNA aus selektiv angezogenen Hefezellen ergaben ein kräftiges Bandenmuster, RNA ohne poly(A) hybridisiert dagegen nicht (Abb.3). Wie sich bei der späteren Kartierung herausstellte, handelt es sich um insgesamt 12 RNAs, davon sind 7 recht häufig (Tab.1). Es sind zum Teil die gleichen RNAs wie in H1 (s. 3.2 und 3.3), aber es fällt auf, daß diese Banden in YT6001 wesentlich intensiver als in H1 sind. Auf diese Mengenunterschiede soll später eingegangen werden (s. 3.6). Auffallende neue Transkripte sind 3030b, 1780b und 1470b lang.

3.2 Kartierung der Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA

Die Lage der Transkriptionsbereiche wurde mit Fragmenten der 2µm-DNA als Hybridisierungsproben eingegrenzt. Dazu wurden zuerst ihre klonierten HindIII-Fragmente aus den Plasmiden BTYH2 bis BTYH5 (Hollenberg, 1978) verwendet. Diese Proben hybridisieren jedoch noch jeweils mit mehreren RNAs, so daß besonders zwischen 1200 und 1400b keine klare Unterscheidung der Banden möglich war. In diesem kritischen Bereich gibt es vier Transkripte, die im Gel bei einer Laufstrecke von 150mm alle innerhalb von 11-12mm liegen. Deshalb wurden kleinere DNA-Fragmente aus Plasmid-DNA von BTYP-1 isoliert und zusätzlich als Hybridisierungsproben verwendet. Einen Überblick über diese Fragmente und ihre Bezeichnungen gibt Abb.4. Mit diesen kleineren DNA-Proben hybridisierten jeweils nur ein bis zwei RNAs und ihre Auflösung war dadurch erleichtert. Allerdings war in einigen Fällen, in denen nur eine dieser Banden auftrat, ihre Zuordnung zu einer RNA erschwert. Hier erzielte ich gute Ergebnisse durch die erneute Hybridisierung der Filter mit einer anderen Probe, nachdem die erste radioaktive Probe vollständig abgewaschen worden war. Die Kartierung der Transkripte von

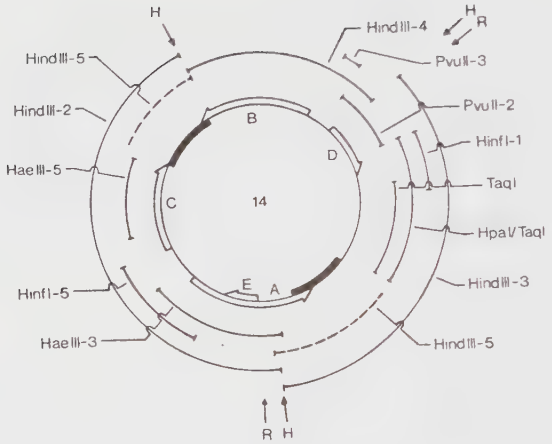


Abb.4: Karte der 2µm-DNA(14) mit den Restriktionsfragmenten, die zur Kartierung in den "Northern"-Experimenten eingesetzt wurden. Die HindIII-Fragmente stammen aus den Plasmiden BTYH2-BTYH5, alle anderen aus BTYP-1. Die Lage von HindIII-5 kann nicht angegeben werden, da es ursprünglich von Typ 23 stammt; die Bereiche, die homolog zu HindIII-5 sind, sind durch gestrichelte Bereiche gekennzeichnet; radiale Pfeile (außen) geben die Lage der EcoRI-(R) und HindIII-Schnittstellen (H) an. Beschriftung sonst wie in Abb.1.

2µm-DNA wurde weiter sehr erschwert durch die geringe Intensität der Banden. Deshalb wurden auch die wesentlich kräftigeren Banden der 2µmLEU2-DNA zur Auswertung herangezogen, wo dies zweifelsfrei möglich war. Zum Nachweis von LEU2-Sequenzen in RNAs aus YT6001 wurde mit pKB4102 hybridisiert, einem Derivat von pBR322 mit dem 2,2kb großen SalI-XhoI-Fragment des LEU2-Gens, hergestellt von K. Breunig. Nach der Auswertung aller Versuche (Abb.5) ergibt sich folgendes Bild (s. auch Abb.8 und 9)

S-Segment: Da das S-Segment der 2µm-DNA in 2µmLEU2-DNA nicht verändert ist, werden in diesem Bereich von beiden Plasmiden die gleichen Transkripte abgelesen. Es sind RNAs von 2770b, 1420b, 1280b und 1190b Länge. In YT6001 liegt wesentlich mehr von diesen RNAs vor, die Intensitätsverhältnisse der Banden sind jedoch in beiden Stämmen gleich. Von 2µmLEU2-DNA stammen noch zwei weitere Banden von 3030b und 1780b. Die Transkripte werden nun einzeln in der Reihenfolge abnehmender Intensität besprochen.

Die starke Hybridisierung der 1280b-RNA mit den Fragmenten HaeIII-3, HinfI-5 und HindIII-5 (Abb.5A) zeigt, daß sie im Bereich des Leserahmens A codiert wird. Berücksichtigt man auch, daß mit HinfI-5 ihre Intensität relativ zur 1420b-RNA deutlich geringer ist als mit HaeIII-3 oder mit HindIII-5, dann liegt ihr Transkriptionsbereich zwischen etwa NT 5500 und NT 700 auf der Sequenz der 2µm-DNA (Hartley & Donelson, 1980). Zieht man von den 1280b der RNA noch etwa 50b für den poly(A)-Rest ab (McLaughlin et al., 1973), so hat dieses Transkript im angegebenen Bereich noch einen "Spielraum" von etwa 280bp, um den seine Lage unbestimmt bleibt. Eine etwas schwächere Bande entsprechend 1420b hat qualitativ die gleichen Hybridisierungseigenschaften wie eben beschrieben (Abb.5A). Da sie jedoch verglichen mit der 1280b-RNA mit HinfI-5 stärker und mit HaeIII-3 fast gleich stark hybridisiert, reicht ihr Transkriptionsbereich weiter in das HinfI-5-Fragment hinein. Für diese RNA kann der codierende Bereich etwa zwischen NT 5200 und NT 750 auf der 2µm-DNA angegeben werden. Das sind etwa 350bp vor und 230bp hinter dem Leserahmen A.

Die 1190b-RNA gibt nur mit HaeIII-5 ein starkes Signal (Abb.5A), liegt also im Bereich des Leserahmens C. Aufgrund ihrer Länge müßte sie auch zum Teil entweder zu

HinfI-5 oder der IR-Sequenz in HindIII-5 komplementär sein, doch stört bei beiden Proben die sehr intensive, benachbarte 1280b-RNA. Da mit HindIII-5 eine schwache Hybridisierung erkennbar wird, enthält die RNA etwas IR-Sequenz. Ihre Lage läßt sich nur recht ungenau zwischen etwa NT 3800-4000 und NT 5200-5400 angeben. Alle Fragmente des S-Segments hybridisierten mit dem Transkript von 2770b Länge. Es überdeckt nicht nur diesen gesamten Bereich, sondern muß noch mindestens mit etwa 340b in die IR-Sequenzen hineinreichen. Mit den angrenzenden Fragmenten des L-Segments, HindIII-4 und HpaI/TaqI bzw. TaqI, hybridisiert es dagegen sicher nicht. Zusätzlich zu diesen häufigeren RNAs konnten im S-Segment noch wesentlich seltenere Spezies gefunden werden. Sie sind etwa 2430b und 930b lang, eine weitere sehr schwache Bande liegt im Längenbereich von 1550 bis 1600b. Sie ist wahrscheinlich identisch mit der 1580b-RNA von YT6001 und wird dort besprochen. Die 930b-RNA hybridisiert mit HaeIII-3 und HindIII-5. Eine weitere Kartierung dieser Transkripte war nicht möglich.

L-Segment: Die Transkripte der 2µm- und 2µmLEU2-DNA können im L-Segment nicht gemeinsam behandelt werden, da hier die Insertion des LEU2-Gens liegt und sich die RNAs beider Stämme deutlich unterscheiden. In H1 werden in diesem Segment RNAs der Längen 2040b, ca. 1600b, 1320b und 700b von der 2µm-DNA abgelesen.
Die intensivste Bande bei 1320b hybridisiert hauptsächlich mit HindIII-4 und PvuII-3 (Abb.5) Dieses Transkript enthält also Sequenzen des Leserahmens B. Da es mit dem angrenzenden PvuII-2 nicht hybridisiert, muß es aufgrund seiner Länge mindestens etwa 160bp in das IR hineinragen. Durch die enge Nachbarschaft dieser Bande im Autoradiogramm zur intensiven 1280b-Bande aus dem S-Segment kann diese Homologie jedoch nicht festgestellt werden. Das eine Ende der RNA läßt sich auf der 2µm-DNA im Bereich

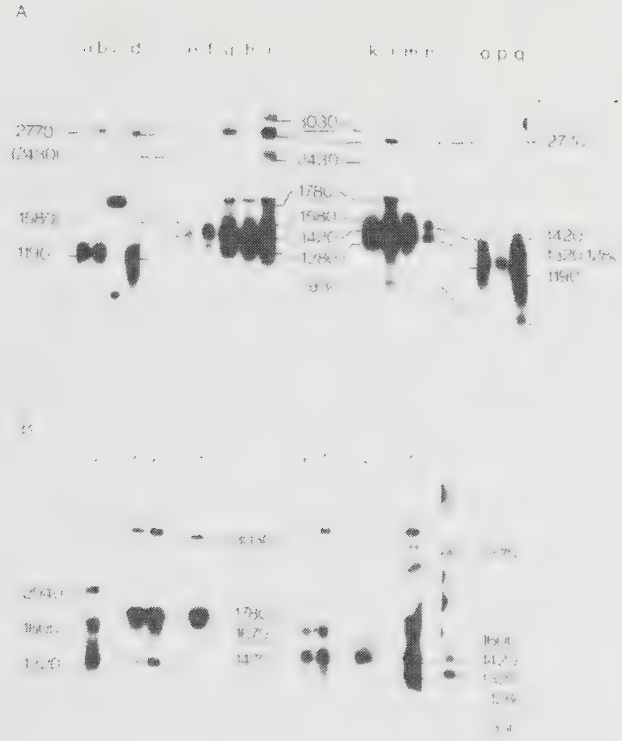


Abb.5: Kartierung von Transkripten der 2µm-DNA und 2µmLEU2-DNA in poly(A)-RNA.
A: Transkripte im S-Segment; a-d: hybridisiert mit HaeIII-5; a: H1 (p = polysomal), b: H1 (g = gesamt), c: DNA-Marker, d: YT6001 (g); e-i: hybridisiert mit HinfI-5; e: H1 (p); f: H1 (g); g,i: YT6001 (g); h: YT6001 (p); k-n: hybridisiert mit HaeIII-3; k: YT6001 (p); l: YT6001 (g), m,n: H1 (g); o-q: hybridisiert mit HindIII-5; o,p: H1 (g), q: YT6001 (g).
B: Transkripte im L-Segment; a-c: hybridisiert mit HindIII-4; a: H1 (g), b,c: YT6001 (p bzw. g); d: YT6001 (g) hybridisiert mit PvuII-2; e,f: YT6001 (p bzw. g) hybridisiert mit pKB4102; g: YT6001 (g) hybridisiert mit HpaI/TaqI; h,i: hybridisiert mit HindIII-3; h: YT6001 (g), i: H1 (g). Alle Längen in Basen, neue Transkripte von 2µmLEU2-DNA unterstrichen.

NT 2600-2700 festlegen, das andere Ende müßte dann etwa bei NT 3870-3970 liegen.

Die Banden der beiden größeren RNAs, 2040b und ca. 1600b, sind wesentlich schwächer. Sie hybridisieren mit HindIII-3 und -4, PvuII-2 und -3. Eine genauere Kartierung war jedoch nicht möglich. Die 1600b-RNA fällt auf wegen ihrer eigenartig diffusen Bande. Die schwache 700b-RNA konnte dem Bereich um HinfI-1 zugeordnet werden.

Im L-Segment der 2µmLEU2-DNA werden RNAs von 3030b, 1780b, 1670b, 1470b und 1320b Länge transkribiert. Davon kommt nur die 1320b-RNA auch in H1 vor. Alle anderen sind durch die Insertion des LEU2-Fragments entstanden und hybridisieren sowohl mit 2µm- wie mit LEU2-Sequenzen (Abb.5B).

Die intensivste Bande entsprechend 1780b hybridisiert mit HindIII-4, PvuII-2 und -3 sehr stark und stammt daher aus dem Bereich des Leserahmens B. Die schwächere Hybridisierung mit pKB4102 zeigt, daß ein kleinerer Teil der RNA auch mit dem LEU2-Fragment homolog ist. Da mit HindIII-5 keine Bande gefunden wurde, hat die 1780b-RNA keine Sequenzen mit dem IR gemeinsam. Dies paßt zu den anderen Daten, da das IR-Element und das LEU2-Gen schon 1713bp voneinander entfernt liegen. Überraschend ist daher die starke Hybridisierung mit HindIII-2. Bei der Kartierung der RNAs im S-Segment war diese 1780b-RNA schon aufgefallen, da sie nicht widerspruchsfrei zu lokalisieren war. Der durch die angrenzenden, nicht hybridisierenden Fragmente abgesteckte Bereich war zu klein dafür. Deshalb ist eine Erklärung dieser Beobachtung durch zwei 1780b-RNAs im L- und S-Segment unbefriedigend. Die Hybridisierung mit beiden Segmenten der 2µm-DNA kann kein Artefakt sein. Eine Kontamination der Hybridisierungsproben mit anderen Fragmenten ließe sich sehr einfach am DNA-Marker feststellen. Dort sind im Gel Fragmente der ganzen

2µm-DNA vorhanden und man kann anhand der hybridisierenden Fragmente leicht verfolgen, welche Sequenzen in der radioaktiven Probe enthalten waren. Sequenzhomologien des L- und S-Segments von 2µm-DNA werden nicht berichtet (Hartley & Donelson, 1970) und wurden auch bei anderen RNAs aus dem gleichen Bereich nicht beobachtet. Für eine RNA, die mit weit voneinander entfernt liegenden DNA-Proben hybridisiert, bleibt nur die Möglichkeit, sie als das gespleißte Produkt einer wesentlich größeren Vorläufer-RNA anzusehen (s. 5.2). Ähnliche Ergebnisse erhielt ich mit der 3030b-RNA. Im L-Segment von 2µmLEU2-DNA erstreckt sich ihre Homologie über LEU2, PvuII-2 und -3 und HindIII-4. Sie ließe sich in diesem Bereich knapp unterbringen, hybridisiert jedoch auch im S-Segment mit HaeIII-3 und HinfI-5, genauso wie das 1780b-Transkript. Die 3030b- und 1780b-RNAs scheinen daher einen ähnlichen Reifungsprozeß durchgemacht zu haben.
Das starke 1470b-Transkript hybridisiert hauptsächlich mit LEU2. Eine schwächere Homologie liegt mit HinfI-1 und TaqI vor, nicht dagegen mit PvuII-2 auf der anderen Seite des LEU2-Fragments. Die RNA liegt also so auf der Karte von 2µmLEU2-DNA, daß ein Ende im LEU2-Fragment, das andere im Bereich von etwa NT 1700-1800 auf der 2µm-Sequenz liegt. Die RNA von 1670b Länge ist wegen der benachbarten 1780b-Bande nur schwer zu kartieren. Sie hybridisiert mit LEU2, HindIII-3 und schwächer mit PvuII-2, nicht dagegen mit HindIII-4 und wahrscheinlich auch nicht mit HinfI-1 oder TaqI. Damit ist ihre Lage ziemlich genau auf den Raum zwischen diesen drei Fragmenten eingeschränkt, dem Bereich zwischen NT 2000 und NT 2320 auf der 2µm-DNA und dem anschließenden LEU2-Fragment. Da dies zusammen nur etwa 1570bp sind, muß angenommen werden, daß die 1670b-RNA mit einem Ende noch etwa 50 bis 70b in die angrenzenden Bereiche hineinragt, ohne in der Hybridisierung als Bande erkennbar zu sein. Diese RNA kann nichts mit der ca. 1600b-RNA von 2µm-DNA gemein haben, da das 2µmLEU2-Transkript fast nur das LEU2-Gen umfaßt.

Vergleicht man diese Ergebnisse der 2µm- und 2µmLEU2-DNA mit der Karte der Leserahmen, so fällt auf, daß in beiden Hefestämmen jedem der drei großen Leserahmen A, B und C der 2µm-DNA ziemlich exakt eine kräftige RNA-Bande zugeordnet werden kann (Abb.8,9). Für A ist das die 1420b-RNA, für B die 1320b-RNA und für C die 1190b-RNA. Bevor sie jedoch als mRNAs dieser Gene bezeichnet werden können, muß noch die Transkriptionsrichtung bestimmt werden. Überraschend ist die sehr häufige 1280b-RNA, die aus der Region um Leserahmen A stammt. Sie ist jedoch für dessen mRNA zu klein und für ein Transkript von Leserahmen E viel zu groß. In der 2µmLEU2-DNA treten einige Transkripte neu auf. Sie stammen alle aus dem L-Segment und haben starke Homologie zum LEU2-Gen. Dieser DNA-Bereich wird relativ stark transkribiert. Zwei dieser RNAs hybridisieren auch mit einem Teil des S-Segments. Sie können deshalb nur als die gespleißten Produkte von langen Primärtranskripten erklärt werden. Möglicherweise stammen sie beide von einem Primärtranskript ab, das mindestens 4,8kb lang ist.

3.3 Untersuchung der Transkriptionsrichtung

Nachdem die Transkripte der 2µm- und 2µmLEU2-DNA näher charakterisiert und kartiert worden sind, ist vor allem ihre Transkriptionsrichtung wichtig für die Beurteilung der möglichen Funktionen der einzelnen RNAs. Zur Bestimmung der Transkriptionsrichtung wurden die HindIII-Fragmente 2 bis 5 der 2µm-DNA aus den BTYH-Plasmiden in den einzelsträngigen Vektor fd109 (Herrmann et al., 1980) umkloniert. Die doppelsträngige DNA (RF-Form) von fd109 wurde dazu mit HindIII geschnitten, mit den 2µm-Fragmenten ligiert und in E.coli 490 transformiert. Die Transformanten waren an den schwachen Plaques zu erkennen, die sich in einem Rasen von E.coli 3300 (Hfr) um sie bildete. Da bei der Konstruktion dieser Rekombinantphagen keine Selektion möglich war, die eine Unterscheidung der Transformanten mit Insertion in

fd109 von den übrigen erlaubte, wurden alle Transformanten durch Plaque-Hybridisierung (Benton & Davis, 1977) auf 2µm-Sequenzen getestet (Abb.6). Von positiven Klonen wurden Minilysate gemacht und die klonierten Fragmente nach HindIII-Spaltung durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Da sich die Orientierung der insertierten Fragmente relativ zum Vektor in den Minilysaten nicht ermitteln ließ, wurden die einzelsträngigen Phagen-DNAs verschiedener Klone paarweise miteinander in Lösung hybridisiert (Herrmann et al., 1980). Enthalten sie die Fragmente in umgekehrter Orientierung, so sind die Einzelstränge im Bereich des insertierten Fragments komplementär und hybridisieren miteinander. Dieses Hybrid hat eine wesentlich geringere Mobilität in der Elektrophorese und läßt sich daher leicht feststellen (Abb.6).

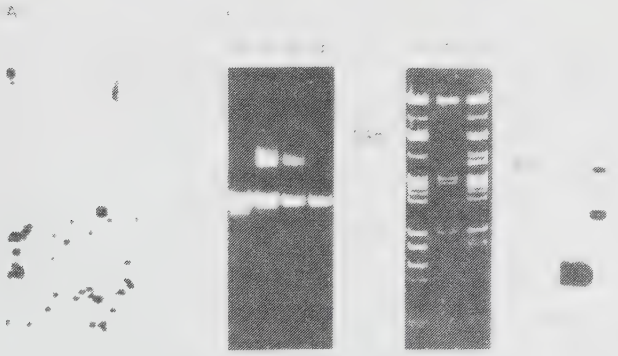


Abb.6: Klonierung der HindIII-Fragmente in fd109.
A: Plaque-Hybridisierung der rekombinanten fd-Phagen mit 2µm-DNA als radioaktiver Probe.
B: Bestimmung der Orientierung des klonierten Fragments; a: einzelsträngige DNA von fd-Klon G7; b,c: Gemisch der einzelsträngigen Phagen-DNAs von G7 und P2, obere Bande stammt vom Hybrid; d: einzelsträngige DNA von fd-Klon P2; Analyse im 1% Agarose-Gel, Anfärbung mit Ethidiumbromid. e-g: doppelsträngige Phagen-DNA mit TaqI geschnitten; e: Klon M1; f: fd109; g: Klon K6; Analyse im 7,5% Polyacrylamid-Gel, Anfärbung mit Ethidiumbromid. Die Längen der differierenden Fragmente sind in bp angegeben. h-k: Test der einzelsträngigen Phagen-DNAs auf Abwesenheit von doppelsträngiger DNA; h,i: Phagen-DNA von M1 bzw. K6; k: doppelsträngige DNA von K6; Analyse nach Southern (1975).

Diese Bande fehlt bei DNA-Paaren mit Fragmenten in gleicher Orientierung. Von den so gebildeten Paaren unterschiedlicher Insertionsrichtung der HindIII-Fragmente wurde einzel- und doppelsträngige DNA isoliert. Die Bestimmung der absoluten Orientierung erfolgte durch Restriktionskartierung der doppelsträngigen DNA (Abb.6). Nachdem die einzelsträngige DNA dieser rekombinanten Phagen durch Hybridisierung nach Southern (1975) auf das Fehlen doppelsträngiger DNA untersucht worden war (Abb.6), dienten sie als spezifische Einzelstrangproben in "Sandwich-Northern"-Experimenten nach Broach et al. (1979). Leider waren die Klone mit dem HindIII-2-Fragment in einer Orientierung instabil, so daß für das S-Segment der 2µm-DNA nur eine Probe vorlag. Sie enthielt den codierenden Strang des Leserahmens A.

Jedes Nitrozellulose-Filter mit gebundener RNA wurde mit einer Einzelstrang-Probe hybridisiert. Dabei kann die DNA über das insertierte 2µm-Fragment an ein Transkript der 2µm-DNA binden, wenn die Sequenzen komplementär sind. Die rekombinante Phagen-DNA bindet deshalb nur an Transkripte des klonierten Strangs. Die Arme der Phagen-DNA zu beiden Seiten bleiben frei. Nach gründlichem Waschen unter Hybridisierungsbedingungen wurden alle Filter gemeinsam mit ^{32}P-markierter doppelsträngiger DNA des Vektors fd109 inkubiert. Der nicht-virale Strang der radioaktiven Probe hybridisiert mit den Enden der an RNA gebundenen rekombinanten Phagen-DNA, so daß eine Art Sandwich-Struktur entsteht. Auf diese Weise ist mit einer ^{32}P-Probe die Hybridisierung von Filtern mit verschiedenen Einzelstrang-Proben möglich. Mit dieser Technik gelang es, die Transkriptionsrichtung der meisten RNAs festzustellen. Dabei trat jedoch eine überproportionale Abnahme der Signalintensität schwächerer Banden auf, verglichen mit normalen Hybridisierungen. Die Richtung der seltener Transkripte konnte daher nicht bestimmt werden. Die wichtigsten Autoradiogramme zu den im folgenden diskutierten Ergebnissen sind in Abb.7 zusammengefaßt.

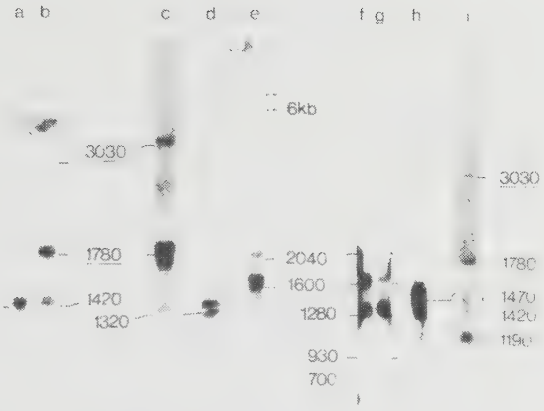


Abb.7: Bestimmung der Transkriptionsrichtung. "Sandwich-Northern" mit RNA aus H1 und YT6001 (s. Text). a,b: hybridisiert mit A2, dem Fragment HindIII-2 des Strangs codierend für Leserahmen A; a: H1; b: YT6001; c,d: hybridisiert mit P2 (HindIII-4, Leserahmen B); c: YT6001; d: H1; e: H1-RNA hybridisiert mit G7 (HindIII-4, anti-B); f-h: hybridisiert mit K6 (HindIII-3, anti-A); f,g: H1; h: YT6001; i: YT6001-RNA hybridisiert mit M1 (HindIII-3, Leserahmen A). Bezeichnungen wie in Abb.3.

Mit der einzelsträngigen DNA-Probe A2, die vom HindIII-2-Fragment den Strang mit der codierenden DNA des Leserahmens A enthält, hybridisierte nur die 1420b-RNA von H1 und von YT6001 die 3030b-, 1780b- und 1420b-RNAs, wahrscheinlich auch die 2770b-RNA. Daraus ergibt sich, daß diese RNAs im S-Sgement in Richtung des Leserahmens A abgelesen werden, während die anderen häufigen Transkripte des S-Segments, die 1280b- und 1190b-RNAs vom Gegenstrang stammen.

Im L-Segment konnten mit Hilfe der beiden HindIII-4-Proben P2 (codierend für B) und G7 (anti-B) die 1320b-RNAs aus beiden Stämmen und die 3030b- und 1780b-RNAs aus YT6001 als Transkripte in Richtung des Leserahmens B kartiert werden. Mit M1, dem HindIII-3-Fragment des gleichen Einzelstrangs wie P2 (B) und K6, dem Gegenstrang (anti-B), wurden diese Ergebnisse bestätigt. Die 2770b- und 1420b-

RNAs hybridisieren mit den IR-Sequenzen und dem kurzen Stück S-Segment von HindIII-3. Die 1190b-RNA hybridisiert nur über das IR-Element, von dem sie die gleiche Sequenz enthält wie die 1420b-RNA, da sie in umgekehrter Richtung in das andere IR-Element hineinläuft. Die typischen Transkripte der LEU2-Region von 3030b, 1780b und 1670b ergaben ebenfalls sehr schwache Banden mit M1. Mit K6 hybridisieren dagegen die starke 1470b-Bande von YT6001 und die 2040b-, 1600b- und 700b-RNAs von H1. Ebenso hybridisieren die 1280b- und 930b-RNAs mit K6. Ihre Transkription läuft also von IR2 weg in das S-Segment hinein, was sich mit den Beobachtungen mit A2 deckt. Unklar ist nur eine deutliche 1780b-Bande mit K6 geblieben, die jedoch wesentlich schwächer ist als mit M1. Mit dieser Ausnahme lassen sich die Daten zu einem geschlossenen Bild der Transkription von 2µm- und 2µmLEU2-DNA zusammenfassen (Abb.8 und 9).

2µm-DNA (H1): Die 1420b-, 1320b- und 1190b-RNAs werden auf der 2µm-DNA von den Leserahmen A, B und C transkribiert (Abb.8). Sie sind sehr wahrscheinlich die mRNAs der vermuteten FLP-, REP1- und REP2-Gene. Dagegen stammt ein anderes, sehr häufiges Transkript der 2µm-DNA, die 1280b-RNA, vom Gegenstrang des Leserahmens A. Es enthält die Information des Leserahmens E, ist jedoch für dessen 348bp viel zu groß. Die 1280b- und eventuell auch die 930b-RNA könnten vom RNA-Start bei NT 350 stammen, der von Breunig et al. (1982) kartiert wurde. In diesem Bereich liegen zwei Startcodons der Translation in einem anderen Raster als E (NT 371 und 341), sie werden jedoch in ihrem Raster von Stopcodons gefolgt (UAG bei 191 und 143, UGA bei 92). Es wären deshalb mehrere Spleißvorgänge nötig, um dieser RNA einen offenen Leserahmen passender Größe zuzuordnen, der sich von den Startpunkten bei NT 371 oder 341 bis in den Leserahmen E fortsetzt. Es wird deshalb angenommen, daß die 1280b-RNA keine Funktion als mRNA hat. Eine andere Möglichkeit wäre viel-

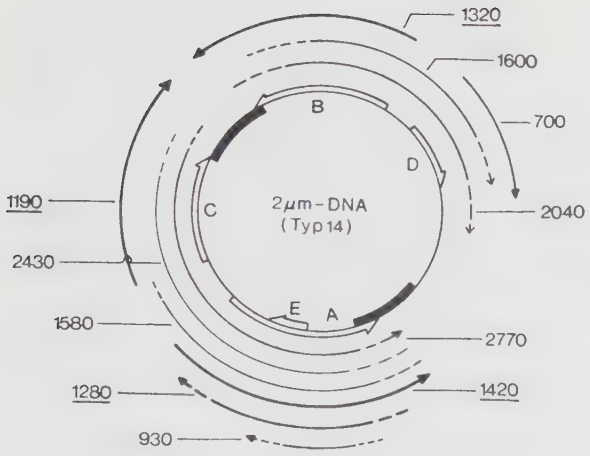


Abb.8: Transkriptionskarte der 2µm-DNA.
Schematische Darstellung der 2µm-DNA(14) mit den im Hefestamm H1 kartierten Transkripten. Die Pfeile geben Lage und Transkriptionsrichtung (5'-3') an; wo keine Pfeilspitze eingezeichnet ist, ist die Richtung unbestimmt; gestrichelte Linien deuten Bereiche an, in denen die Homologie nicht gesichert ist; die Dicke der Pfeile gibt etwa die Intensität der Banden wieder; die mRNAs der drei Gene sind unterstrichen; alle Bezeichnungen wie in Abb.1.

leicht, daß aufgrund der fast gleichen Länge diese RNA identisch ist mit der 1320b-RNA des Leserahmens B. Diese hypothetische 1300b-RNA müßte jedoch auch gespleißt sein, damit sie Sequenzen von A und B zugleich enthalten kann. Diese Möglichkeit wurde in 3.4 untersucht und konnte ausgeschlossen werden.

Die 2040b- und ca. 1600b-RNAs aus dem L-Segment sollten die Information des Leserahmens D enthalten. Ihnen könnte jedoch nur nach Annahme mehrerer Spleißereignisse ein entsprechend großes Leseraster zugeordnet werden. Ihre Funktionen in der Zelle bleiben unbekannt.

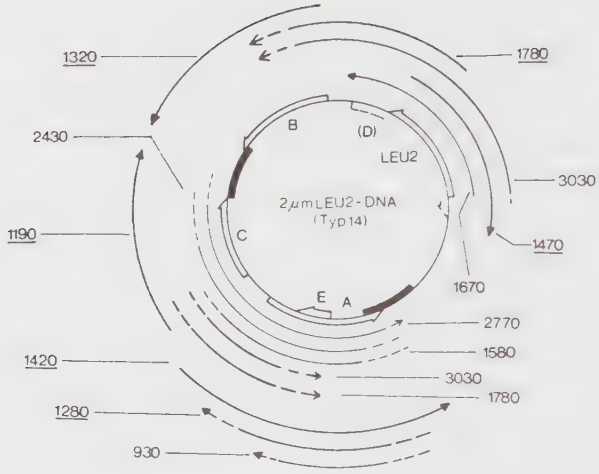


Abb.9: Transkriptionskarte der 2µmLEU2-DNA. Schematische Darstellung von 2µmLEU2-DNA(14) mit den in YT6001 festgestellten und kartierten Transkripten. Die Benennungen sind analog zu Abb.8.

2µmLEU2-DNA (YT6001): Auf der 2µmLEU2-DNA werden ebenfalls die 1420b-, 1320b- und 1190b-RNAs von den drei großen Leserahmen abgelesen, und die 1280b-RNA des Gegenstrangs von A hat wohl keine proteincodierende Funktion. Die anderen häufigen RNAs stehen alle in Zusammenhang mit dem LEU2-Gen, als funktionelles Transkript kommt jedoch nur die 1670b- oder die 3030b-RNA in Frage. Sie werden beide vom codierenden Strang abgelesen und ihre Homologie im L-Segment beginnt am Anfang des LEU2-Gens. Auch die 1780b-RNA stammt von diesem Strang. Da alle drei RNAs Fusionsprodukte der Insertion sind, die 3030b- und 1780b-RNAs außerdem noch gespleißt werden, ist es schwierig, etwas über ihre Funktion in der Zelle auszusagen (s. 5.2). Ein Stück der 1780b-RNA beginnt am Ende des LEU2-Gens und endet irgendwo im Leserahmen B. Ein anderes

Stück von dieser RNA wird im S-Segment transkribiert und beide durch Spleißen verbunden. Die 3030b-RNA unterscheidet sich von ihr nur durch ein 1250b längeres Stück im L-Segment, das am Anfang des LEU2-Gens beginnt und dessen ganze Sequenz enthält. Die 1470b-RNA, die vom Gegenstrang in L abgelesen wird, ist wohl ein Artefakt der Insertion. Ihr Startpunkt muß im Übergangsbereich zwischen 2µm- und LEU2-Sequenzen liegen. Sie wird vom nicht-codierenden Strang des LEU2-Gens transkribiert und endet in der 2µm-DNA.

3.4 S1-Kartierung einiger Transkripte der 2µm-DNA

Für das 1320b-Transkript des Leserahmens B sollte untersucht werden, ob es sich eventuell um ein gespleißtes Produkt handelt, dessen angespleißter Teil aus dem S-Segment die Hybridisierung einer 1280b-RNA im S-Segment vorgetäuscht haben könnte (s.3.3). Diese Untersuchung wurde durch Kartierung mit der einzelstrangspezifischen S1-Nuklease durchgeführt. Dazu wurde poly(A)-RNA aus dem Stamm H1 in Lösung hybridisiert mit einzelsträngiger fd-DNA, die die Fragmente HindIII-4 bzw. -5 enthielt. HindIII-4 trägt einen 991bp langen Teil des Leserahmens B mit dem 5'-Ende und HindIII-5 die restlichen 127bp vom 3'-Ende. Nachdem von den Hybriden die überstehenden Einzelstränge mit S1-Nuklease abgebaut worden war, konnten sie denaturiert und mit Hilfe der "Northern"-Technik analysiert werden. Die Länge des im Hybrid geschützten RNA-Stücks läßt sich dann aus der Lage der Bande ermitteln. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der S1-Kartierung nach Berk und Sharp (1977) liegt darin, daß keine DNA-Fragmente speziell isoliert und endmarkiert werden mußten, sondern mehrere verschiedene Proben mit einer ^{32}P-DNA gemeinsam untersucht werden konnten. Allerdings ist keine Bestimmung des Startpunkts möglich, sondern nur die Länge der Homologie von RNA- und DNA-Fragmenten.

Bei dem Experiment mit dem codierenden Strang des Leserahmens B von HindIII-4-Fragment P2 trat ein starkes 1000b-Fragment auf und ein schwaches von etwa 340b, das nicht erklärt werden kann (Abb.10b). Das 1000b-Stück deckt sich ziemlich genau mit dem 991bp-Teil des Leserahmens B. Die Genauigkeit der Messung liegt jedoch nur bei ±30b, so daß man nicht auf einen Start der RNA bei -9bp des Leserahmens schließen kann. Da nach den bisherigen Beobachtungen in Hefe ein Gen nicht exprimiert werden kann, wenn der 5'-nicht-translatierte Bereich seiner RNA noch ein ATG-Codon enthält, das von einem Stopcodon gefolgt wird oder in einem anderen Raster liegt (Sherman & Stewart, 1975; Sherman et al., 1980; Stiles et al., 1981; Breunig et al., 1982; B. Hall, pers.Mitt.), war schon aus der Sequenz der 2µm-DNA ersichtlich, daß das Transkript des Leserahmens B erst kurz vor dem Startcodon beginnen kann. Vor dem Leserahmen B liegen nämlich bei -18bp und -33bp zwei ATG-Codons im gleichen Raster,

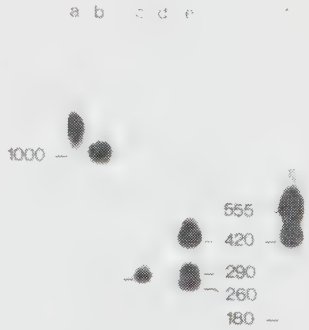


Abb.10: S1-Kartierung der Transkripte von 2µm-DNA.
a,d: Kontrollen; b,c,d und f: 20µg poly(A)-RNA von H1 hybridisiert mit 4µg einzelsträngiger DNA von fd-Klonen mit HindIII-Fragmenten der 2µm-DNA, mit S1-Nuklease abgebaut und Fragmente durch "Northern"-Technik nachgewiesen. a: 12µg RNA ohne fd-DNA, ohne S1-Abbau; b: hybridisiert mit P2 (HindIII-4; codierender Strang von Leserahmen B); c: hybridisiert mit D1 (HindIII-5; codierend für A, nicht-codierend für B); d: 20µg RNA ohne fd-DNA, mit S1 abgebaut; e: hybridisiert mit D5 (HindIII-5; codierend für B, nicht-codierend für A); f: K6 (HindIII-3; codierend für A, nicht-codierend für B).

gefolgt von einem Stopcodon bei -6bp. Das restliche Stück der 1320b-RNA konnte mit dem HindIII-5-Fragment D5 als ein ca. 260b langes Fragment nachgewiesen werden. Daneben traten noch Banden von 290b und 420b auf, die später besprochen werden. Mit den beiden RNA-Stücken von 1000b und 260b Länge läßt sich die 1320b-RNA gut als Transkript des Leserahmens B erklären, wenn man noch einen etwa 60b langen poly(A)-Schwanz annimmt.

Da die hier angewandte Methode keine Bestimmung der Lage des RNA-Fragments innerhalb der DNA-Probe erlaubt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß das 1000b-Fragment am anderen Ende oder im Innern der DNA-Probe liegt. Zur Erklärung der hypothetischen 1300b-RNA in Leserahmen A und B müßte es sich dann allerdings um eine RNA handeln mit einem 1000b-Stück komplementär zum HindIII-4-Fragment und den restlichen maximal 300b aus dem S-Segment. Die Daten der "Northern"-Experimente schließen dies jedoch eindeutig aus, da das kleine RNA-Stück nicht sowohl mit HinfI-5, HaeIII-3 und HindIII-5 hybridisieren könnte. Daraus ergibt sich mit Sicherheit, daß die 1320b-RNA das Transkript des Leserahmens B ist und nicht durch Spleißen entsteht. Da Broach und Hicks (1980) postulierten, dieser Leserahmen sei Bestandteil des REP1-Gens der 2µm-DNA, kann die 1320b-RNA als mRNA dieses Gens angesehen werden. Sie beginnt kurz vor dem Startcodon des Leserahmens und endet etwa 130bp nach dem Leserahmen. Ihr 3'-Ende liegt kurz vor oder zu Beginn des Bereichs im IR-Element, für den größere Sekundärstrukturen (stem and loop structures) postuliert worden sind (Hartley & Donelson, 1980).

Bei diesen S1-Experimenten sind noch weitere geschützte Fragmente kartiert worden. Mit der HindIII-3-Probe K6, die das 3'-Ende des Leserahmens B enthält, wurde neben 290b-, 420b- und 555b-Stücken eine schwache Bande von 180b erhalten (Abb.10f). Dies entspricht exakt der Länge des Hybrids zwischen K6 und dem 3'-Ende der 1320b-RNA, wie

man es nach der Kartierung mit D5 erwartet. Die 290b- und 420b-Stücke mit K6 waren auch mit dem entsprechenden Einzelstrang D5 von HindIII-5 aufgetreten (Abb.10e). Daraus kann man schließen, daß sie von RNAs stammen, deren Transkription im IR beginnt und über das gemeinsame Ende beider Proben in das S-Segment hineinläuft. Dafür kommen mehrere RNAs in Frage. Die 2770b-RNA ausgehend von IR1 und die 1280b- und 930b-RNAs von IR2. Eine mögliche Erklärung beider Fragmente ist, daß eines vom 2770b-Transkript aus IR1 stammt und von den DNA-Proben nur bis zum Ende der IR-Sequenz gegen S1-Abbau geschützt wurde. Das andere Fragment stammt dann wahrscheinlich von den RNAs, die in IR2 starten und deren Hybride bis zum Ende der HindIII-Fragmente durch S1 nicht abgebaut werden konnten. Die Transkription würde dann bei NT 3890 oder 5020 in IR1 starten und bei NT 395 oder 525 in IR2. Erstaunlicherweise deckt sich keiner dieser Starts mit dem von Breunig et al. (1982) bei NT 350 in IR2 kartierten. Das zugehörige Fragment könnte vom 3'-Endfragment der 1320b-RNA verdeckt worden sein. Auf jeden Fall muß es in den IR-Elementen zwei Sequenzen geben, an denen 5'-Enden von Transkripten des S-Segments kartiert werden. Die eine könnte in IR1 aktiv sein und die Transkription der 2770b-RNA bewirken, an der anderen in IR2 könnten die 1280b- und 930b-RNAs starten.

Das 555b-Stück, das mit K6 zusätzlich aufgetreten war, kann nicht aus dem IR oder S-Segment stammen, da man sonst auch mit D5 diese Bande finden müßte. Es handelt sich also um das 3'-Ende einer RNA, die am anderen Ende von HindIII-3 codiert wird. Dafür kommen die 1600b- oder 2040b-RNA in Frage oder die etwa 700b lange RNA, die ein Transkript von Leserahmen D sein könnte. Da bei der S1-Kartierung mit dem angrenzenden HindIII-4-Fragment G7 des gleichen Einzelstrangs überhaupt keine Bande gefunden wurde, die dieses 555b-Stück zu einer anderen bekannten RNA

ergänzen könnte, kann angenommen werden, daß es sich um das 3'-Ende eines etwa 700b langen Transkripts von Leserahmen D handelt. Dessen mRNA kann wie die anderen auch erst kurz vor dem Startcodon beginnen, da bei -30bp ein ATG-Codon liegt. Deshalb sollte das 5'-Fragment dieser RNA bei der S1-Kartierung mit G7 nur maximal 91b lang sein und ist daher im Gel nicht zu sehen. Interessant ist, daß die 2040b-RNA exakt zwischen die Sekundärstruktur in den IR-Elementen und das 3'-Ende der 700b-RNA hineinpaßt.

Ein 270b- bzw. 290b-Stück geschützt von den Fragmenten HindIII-3 (M1) und -5 (D1) (Abb.10c) stammt ziemlich sicher vom 3'-Ende des 1190b-Transkripts von Leserahmen C. Die Transkription dieser RNA sollte demnach bis etwa NT 3040 $\pm$10 in IR1 hineinlaufen. Ihr 3'-nicht-codierender Bereich ist mit etwa 280b sehr lang, er macht etwa ein Viertel ihrer Gesamtlänge aus. Das 3'-Ende liegt ähnlich wie das der 1320b-RNA knapp vor dem Beginn der "stem-and-loop"-Region bei NT 4013, jedoch auf der Seite zum S-Segment hin. Rechnet man von diesem 3'-Ende der RNA etwa 1160b weit zurück, so liegt das 5'-Ende knapp vor dem Stopcodon des Leserahmens C. Mit den gleichen Proben M1 und D1 sollte man auch eine Bande erhalten, die vom Ende der 1420b-RNA des Leserahmens A herrührt. Die Autoradiogramme zeigen jedoch nur einen starken Schmier im erwarteten Bereich von etwa 600-700b (Abb.10c). Dieser könnte auf die 1420b-RNA zurückzuführen sein, doch bleibt das Fehlen einer richtigen Bande unverstanden.

Durch diese S1-Experimente konnten die Transkripte von Leserahmen B, C, und wahrscheinlich auch D der 2µm-DNA exakt kartiert werden. Sie beginnen jeweils recht kurz vor dem Startcodon des Leserahmens im Bereich zwischen etwa -10 und -30bp auf der DNA. Ihr 3'-terminaler nichtcodierender Bereich ist wesentlich länger. Bei der 1320b-

RNA von Leserahmen B sind es etwa 130-150b, bei der 1190b-RNA von C etwa 280b und bei der ungefähr 700b langen RNA von D etwa 75b. Die 3'-Enden der 1320b- und 1190b-RNAs liegen am Beginn der bäumchenartigen Sekundärstruktur im IR-Element. Außerdem konnten in den IR-Sequenzen zwei Startpunkte für RNAs festgestellt werden, die von dort aus in das S-Segment abgelesen werden. Eine Zuordnung der in Frage kommenden RNAs aus dem S-Segment war nicht möglich. Leider konnte der Startpunkt bei NT 350 (Breunig et al., 1982) und das 3'-Ende der 1320b-RNA von Leserahmen A nicht gefunden werden.

3.5 Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA in polysomaler RNA

In 3.1 bis 3.3 wurden eine Reihe von Transkripten der 2µm- und 2µmLEU2-DNA identifiziert, denen keine proteincodierende Funktion zugeordnet werden kann. Nach der von Broach et al. (1979) postulierten Prozessierung hypothetischer Primärtranskripte besteht die Möglichkeit, sie als "Abfallstücke" dieser Vorgänge zu erklären. Sie sollten dann nicht in polysomaler RNA enthalten sein.

Zur Untersuchung dieser Möglichkeit wurden im Rahmen des Großpraktikums von Herrn U. Pott aus den Hefestämmen H1 und YT6001 Polysomen isoliert (Abb.11) und daraus poly(A)-RNA gewonnen. Die Untersuchung dieser RNAs in "Northern"-Experimenten ergab für beide Hefestämme keine erkennbaren Unterschiede im Bandenmuster polysomaler und Gesamt-RNA (Abb.3b,d). Nur die äußerst schwachen Banden zwischen 6 und 12kb scheinen zu fehlen. Bei der Hybridisierung mit kleineren DNA-Fragmenten, die das Auffinden der sonst verdeckten Transkripte erlauben, konnten auch in polysomaler RNA alle Banden der Tabelle 1 identifiziert werden (Abb.5). Bei diesem Experiment kann nicht ausgeschlossen werden, daß im Zytoplasma gelöste oder unspezifisch an

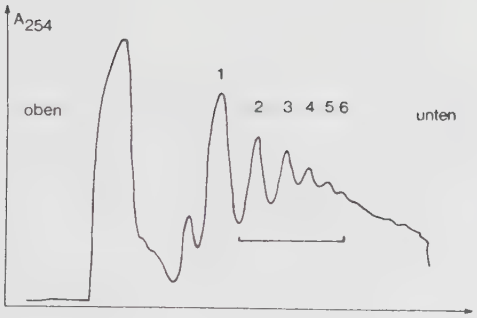


Abb.11: Elutionsprofil eines präparativen Sucrose-Gradienten. 120 OD_{280} Lysat des Hefstamms YT6001; Sedimentation von links nach rechts; Mono- und Polysomen durch Zahlen 1-6 gekennzeichnet; der Balken unter Peak 2-6 gibt die Lage der Fraktionen an, die zur Isolierung von poly(A)-RNA aufgearbeitet wurden.

die Polysomen gebundene RNA als Kontamination in den polysomalen RNA-Proben enthalten war. Da jedoch zumindest eine starke Anreicherung der polysomalen RNA stattgefunden hat (Abb.11), wäre eine Veränderung in den Verhältnissen der Bandenintensitäten von translatierten und nicht-translatierten Transkripten zu erwarten. Das Auftreten aller Transkripte der 2µm- und 2µmLEU2-DNA in der polysomalen RNA-Fraktion bedeutet, daß sie alle translatiert werden oder aus anderen Gründen mit den Polysomen eng assoziiert vorliegen.

3.6 Menge der Transkripte von 2µm- und 2µmLEU2-DNA in der Hefezelle

Wie bereits in 3.1.1 erwähnt, machen die Transkripte der 2µm-DNA nur einen sehr kleinen Teil der poly(A)-Fraktion von H1-RNA aus und ergeben nur sehr schwache Banden im "Northern"-Experiment. Da mit RNA aus YT6001 wesentlich kräftigere Banden entstehen, ist es interessant, die

Mengen der einzelnen Transkripte zu vergleichen. Eine grobe Abschätzung ist möglich, wenn man die Intensität einer RNA-Bande mit der Bande eines etwa gleich großen Fragments der Marker-DNA vergleicht, deren Menge genau bekannt ist. Dabei muß angenommen werden, daß dieser Vergleich nicht durch unterschiedliche Effizienz der "Northern"-Technik für RNA und DNA gestört wird. Gleich starke RNA- und DNA-Banden, deren Intensität im mittleren Bereich der Schwärzungskurve des Röntgenfilms liegt, enthalten dann etwa gleich viel Radioaktivität. Vergleicht man Filter, die mit kleinen DNA-Fragmenten hybridisiert wurden, so kann kein Netzwerk der ^{32}P-DNA entstehen. Gleich viel gebundene Radioaktivität bedeutet dann auch gleich viele Moleküle RNA oder DNA auf dem Filter. Da diese Methode trotzdem noch viele Fehlerquellen enthält, wurde auf eine densitometrische Auswertung der Autoradiogramme verzichtet.

Für die 1190b-RNA, eines der vier stärkeren Transkripte der 2µm-DNA, war die Auswertung besonders gut möglich. Die Intensität der DNA-Bande war unter Berücksichtigung der Expositionszeit etwa 10mal so groß wie die der RNA-Bande. Die DNA-Bande war von einem Fragment von 12ng BTYP-1 (10,7kb ≙ $7x10^6$D) erzeugt worden, sie enthielt also etwa $2x10^9$ einzelsträngige DNA-Moleküle. Demnach sollten in der RNA-Bande etwa $2x10^8$ Moleküle der 1190b-RNA ($4x10^5$D) enthalten sein, entsprechend etwa 0,13ng. Das sind etwa 8ppm der aufgetragenen 17µg poly(A)-RNA. Berücksichtigt man noch, daß darin etwas rRNA enthalten war, so macht die 1190b-RNA etwa 10 bis höchstens 20ppm der reinen poly(A)-RNA aus. Bei der Isolierung der hier verwendeten RNA waren etwa 66mg Gesamt-RNA aus $3,6x10^{10}$ Zellen und davon etwa 900µg poly(A)-RNA (≙1,3%) erhalten worden. Die 17µg sind etwa 1/50 davon, so daß in $3,6x10^{10}$ Zellen etwa $1x10^{10}$ Kopien der 1190b-RNA enthalten sein müssen. Als Untergrenze der Kopienzahl ergeben sich daher

etwa 0,4 Moleküle pro Zelle. Je nach Ausbeute bei der Isolierung könnten es auch 2 bis 3mal soviel sein. Für die anderen RNAs aus H1 konnte die Berechnung nicht mit der gleichen Genauigkeit durchgeführt werden. Doch dürften die 1280b- und 1320b-RNAs höchstens 2- bis 3mal so häufig sein. Alle anderen Transkripte sind dagegen um mindestens einen Faktor 10 seltener als die 1190b-RNA, kommen also sicher mit weniger als 0,1 Kopien pro Zelle vor.

Für poly(A)-RNA aus selektiv angezogenem YT6001 ergibt die analoge Berechnung einen Gehalt von etwa 200ppm 1190b-RNA. Dem entspricht eine Kopienzahl dieser RNA von mindestens 15 Molekülen pro Zelle. Auch die anderen Transkripte der 2µm-Sequenz von 2µmLEU2-DNA dürften etwa 20mal häufiger sein als in H1. Leider läßt sich für die Transkripte aus dem LEU2-Bereich keine gute Abschätzung machen. Da die 1470b- und 1780b-RNAs zu den häufigsten Transkripten von 2µmLEU2-DNA gehören, dürften sie auch mit etwa 20 bis 50 Kopien pro Zelle vorkommen, die 1670b-RNA etwas seltener. Diese hohe Kopienzahl der Transkripte von 2µmLEU2-DNA findet man jedoch nur in selektiv gewachsenen Kulturen von YT6001. Wenn YT6001 dagegen auf mit Leucin (20µg/ml) supplementiertem Minimalmedium angezogen worden war (YT6001(+Leu)), waren die Banden wesentlich schwächer (Abb.12). Mit 2µm-DNA als Hybridisierungsprobe ist die 1780b-Bande die bei weitem stärkste Bande von YT6001 (+Leu), wesentlich stärker sogar als die Bande der nicht aufgelösten RNAs im Bereich zwischen 1200 und 1400b. Obwohl der Vergleich nicht exakt möglich ist, könnte die Zahl der Transkripte mit 2µm-Homologie noch unter der in H1 gelegen haben. Mit pMP78 als Probe auf LEU2-Sequenzen ist die 1470b-Bande in YT6001(+Leu)-RNA am stärksten. Ein ähnlicher Effekt des Mediums auf die RNA-Menge konnte in H1 nicht beobachtet werden.

Abb.12: Vergleich der RNAs aus selektiv und nicht-selektiv angezogenen Zellen von YT6001.
"Northern"-Filter mit 13µg poly(A)-RNA hybridisiert mit a,b: Fragment HindIII-3 + LEU2 (aus pMP78) (Hollenberg, 1979) und c-g: 2µm-DNA; a: nicht-selektiv; b: selektiv; c,e: selektiv, gleiche Probe unterschiedlich lang exponiert; d: nicht-selektiv, exponiert wie e; f: selektiv, RNA ohne poly(A) mit 2 schwachen Banden bei mehr als 6kb (Markierungen rechts); g: H1-RNA als Vergleich.

Die Kopienzahl der 2µmLEU2-DNA ist unter selektiven wie nicht-selektiven Bedingungen in YT6001 etwa gleich hoch und entspricht der von 2µm-DNA in verwandten Stämmen; auch geht 2µmLEU2-DNA unter nicht-selektiven Bedingungen kaum durch Segregation verloren (Erhart, 1983).
Da die großen Unterschiede in der RNA-Menge also nicht durch Veränderung der Kopienzahl der 2µmLEU2-DNA erklärt werden können, muß ein Regulationsmechanismus existieren, der die Menge der Transkripte in Abhängigkeit von der Leucin-Konzentration im Medium kontrolliert. Von dieser Kontrolle sind nicht nur die Transkripte der LEU2-Region betroffen, sondern alle Transkripte der 2µmLEU2-DNA.

3.7 Untersuchung der Transkription von Rekombinantplasmiden der 2µm-DNA mit bakteriellem Vektor.

Die Untersuchung der RNAs von rekombinanten Derivaten der 2µm-DNA sollte Aufschluß darüber geben, wie die Insertion bakterieller DNA die Transkription der 2µm-Sequenzen beeinflußt. Durch Insertion in die EcoRI-Schnittstelle im S-Segment der 2µm-DNA wird das für die Inversion benötigte FLP-Element zerstört (Gerbaud et al., 1979; Broach & Hicks, 1980) und das 2µm-Derivat kann in cir°-Hefen nicht mehr invertiert werden. Daher bietet sich bei der Analyse von RNAs aus Hefestämmen mit solchen Plasmiden die interessante Möglichkeit, nach Unterschieden in der Transkription zu suchen, die zwischen beiden Typen der 2µm-Plasmide auftreten. Dadurch kann die Hypothese einer Regulation der Gene auf der 2µm-DNA durch Inversion eines Segments (Broach et al., 1979) überprüft werden. Deshalb wurde die Transkription der Plasmide pJDB219 (Beggs, 1978), pL610 und pL616 (Erhart, 1983) in isogenen Hefestämmen untersucht. Sie enthalten die 2µmLEU2-DNA und unterscheiden sich nur durch den bakteriellen Anteil (Abb.14); pJDB219 enthält pMB9 (Bolivar, 1977), pL610 und pL616 enthalten pBR325 (Bolivar, 1978). Die Stämme YT200 (2µm-DNA + pJDB219(14+23)) und YT210 (pJDB219(14)) wurden von Frau Erhart zur Verfügung gestellt, YT6-2-1L (cir°, leu2) wurde mit pL610 und pL616 tranformiert. Die Plasmide wurden in den Minilysaten der Leu^+-Kolonien nach Southern (1975) nachgewiesen.

Die Transkripte dieser Plasmide ließen sich in "Northern"-Experimenten sehr leicht nachweisen, da die poly(A)-RNA aus allen Stämmen nach Hybridisierung mit ^{32}P-markierter 2µm-DNA ein sehr intensives Bandenmuster ergaben (Abb.13). Neben der Intensität der Banden fällt auf, daß es eine Reihe definierter Transkripte von 3000 bis 5600b Länge gibt, einem Längenbereich, in dem keine Transkripte

der 2µm- oder 2µmLEU2-DNA gefunden wurden (Tab. 2). Völlig unerwartet ist, daß sich keine Unterschiede im Bandenmuster der Stämme feststellen ließen, die pL610 bzw. pL616 enthielten (Abb.13). Auf kleine Unterschiede zwischen YT200 und YT210 soll später eingegangen werden.

pJDB219(14)	pL610/616
	6600
5500	5600
5250	5200
4700	4700
4400	4450
4250	
	4170
3800	
	3700
3150	3150
3030*	3030*
	2950
	2840
2750	2700
	2540
2380	
2150	
2040**	2040**
1920	
1780*	1780*
1670*	1670*
1470*	1470*
1380	1380
1320**	1320**
1190**	1190**
1050	
900	

Tab.2: Transkripte der Plasmide pJDB219 und pL610/616 in Hefe.
RNAs, die auch von 2µmLEU2-DNA abgelesen werden, sind mit einem Stern gekennzeichnet, solche von 2µm-DNA mit zwei Sternen; starke Transkripte sind unterstrichen.

Die RNAs wurden in den "Northern"-Experimenten von 3.2 zusammen mit den Transkripten von 2µm- und 2µmLEU2-DNA kartiert. In allen Stämmen treten die Transkripte der Leserahmen B und C mit 1320b (Abb.13B a-d) und 1190b (Abb.13A a-c) auf, von der 1190b-RNA liegt besonders viel vor. Die 1420b-RNA vom Leserahmen A und die gegenläufige 1280b-RNA fehlen, da ihre Transkriptionsbereiche durch die bakteriellen DNAs unterbrochen werden. Interessant ist, daß eine 2040b-RNA mit den Hybridisierungseigen-

schaften des entsprechenden Transkripts von H1 gefunden wurde. Anscheinend wird diese RNA durch die Insertion des LEU2-Fragments nicht betroffen (Abb.13B a-d). Die Transkripte aus dem Bereich des LEU2-Gens, die in YT6001 gefunden wurden (3030b, 1780b, 1670b und 1470b), werden auch von allen Rekombinantplasmiden transkribiert. Besonders stark ist die Bande der 3030b-RNA in pL610/616 (Abb.13A u. B). Sie hybridisiert ebenso wie die 1780b-RNA mit Fragmenten des L- und S-Segments. Daraus folgt, daß es sich um die gleichen gespleißten Transkripte wie in YT6001 handelt und die EcoRI-Schnittstelle im S-Segment in ihrem Transkriptionsbereich nicht enthalten ist. Für die 1670b-RNA, die wohl auch hier das funktionelle Transkript des LEU2-Gens ist, konnte in pJDB219 auch eine Hybridisierung mit dem Leserahmen A festgestellt werden (Abb. 13A g-h), doch dürfte es sich dabei um zwei verschiedene RNAs gleicher Länge handeln.

Im Gegensatz zu diesen Transkripten ließen sich die großen RNAs nicht exakt kartieren. Sie hybridisierten alle mit den Proben des L- und S-Segments, nur nicht mit HindIII-4. Zwar enthalten einige dieser RNAs (5500b, 5250b, 4250b und 3800b von pJDB219 und 4700b und 3700b von pL610/616) Sequenzen des bakteriellen Vektors (unveröff. Daten), doch sind diese Teile der Plasmide mit 5,3 und 6kb zu groß, als daß die RNAs eine kontinuierlich vom einen Segment über die bakterielle DNA in das andere Segment transkribierte Sequenz enthalten könnten. Da diese RNAs auch nicht mit HindIII-4 hybridisieren, ist für sie eine kontinuierliche Transkription vom L- in das S-Segment oder umgekehrt ausgeschlossen. Man muß daher für ihre Entstehung Spleißvorgänge annehmen, die vermutlich wie bei der 3030b-RNA am Anfang der LEU2-Sequenz stattgefunden haben. Soweit man aus diesen Daten schließen kann, haben die Transkriptionskarten von pJDB219 und pL610/616

Abb.13: Nachweis und Kartierung der Transkripte von pJDB219, pL610 und pL616 in "Northern"-Experimenten.
A: Kartierung im S-Segment durch Hybridisierung von ca. 5µg poly(A)-RNA mit HaeIII-5 (a-c), HinfI-5 (d-f) und HaeIII-3 (g-k). a: pL616(14); b: pJDB219(14+23) in YT200(cir$^+$); c: pJDB219(14) in YT210 (cir°); d: pL610(23); e: pL616(14); f,g: pJDB219(14+23); h: pJDB219(14); i: DNA-Marker; k: H1-RNA.
B: Kartierung im L-Segment durch Hybridisierung mit HindIII-4 (a-d), PvuII-2 (e-h), pKB4102 (i-n), TaqI (o-r) und HindIII-3 (s-v). a: pL610(23); b: pL616(14); c: pJDB219 (14+23); d: pJDB219(14); e: pL610(23); f: pL616(14); g: pJDB219(14+23); h: pJDB219(14); i: pL610(23); k: pL616(14); l: DNA-Marker; m: pJDB219(14+23); n: pJDB219(14); o: pL616 (14); q: pJDB219(14+23); r: pJDB219(14); s: 2µmLEU2-DNA (YT6001); t: DNA-Marker; u: pJDB219(14+23); v: pJDB219(14).

große Ähnlichkeit. Sie enthalten die gleichen Transkripte, die von 2µmLEU2-DNA her bekannt sind, und analoge Transkriptionsbereiche, in denen die langen RNAs abgelesen werden. Nur in den Längen und Mengenverhältnissen dieser RNAs unterscheiden sie sich teilweise. Da sich diese RNAs nicht exakt kartieren ließen, ist in Abb.14 eine verallgemeinerte Transkriptionskarte von pJDB219(14) angegeben, die auch für pL616(14) zutrifft, wenn man in den Transkriptionsbereichen der höhermolekularen RNAs die pL610/616-typischen RNA-Spezies einsetzt.

Eine grobe Einteilung der großen gespleißten Transkripte ist nach ihrer Hybridisierung im L-Segment möglich. Von pJDB219 hybridisieren dort unter anderem die 5500b- und 5250b-RNAs nur mit PvuII-2, die 4250b-, 3800b- und 3150b-RNAs dagegen nur mit TaqI (Abb.13 g,h und q,r). Die ersteren enthalten daher ein Stück des L-Segments der 2µm-DNA zwischen NT 2000 und NT 2320 und eventuell ein kleineres Stück vom Ende des LEU2-Gens (ähnlich der 1780b-RNA), die anderen das Leu2-Gen und ein Stück der 2µm-Sequenzen auf der anderen Seite von LEU2. Die beiden Gruppen von Transkripten sind in der Transkriptionskarte von Abb.14 als offene Kreissegmente eingetragen. Da jeder Transkriptionsbereich aus einem Teil im L- und S-Segment besteht, gehören auch in Abb.14 jeweils ein Segment in L und S zusammen. Der Bereich der Transkripte vom Typ der 5500b- und 5250b-RNAs ist im L-Segment der 2µm-DNA als inneres und der Bereich der anderen als äußeres Segment eingetragen. Da sich im S-Segment keine Unterschiede feststellen ließen, ist in Abb.14 der gleiche Bereich für die Transkriptionsbereiche beider Typen angegeben, jedoch stammen sicher nicht alle diese gespleißten Transkripte aus dem gesamten, in Abb.14 grob eingegrenzten Bereich. Für die Transkripte von pL610/616 gilt das oben gesagte ganz entsprechend. Die 5200b, 4700b- und 4450b-RNAs kartieren auf der Seite von PvuII-2, die 3700b-RNA auf der anderen. Von den langen

gespleißten RNAs befinden sich demnach 5'- oder 3'-Enden ihrer kontinuierlich transkribierten Teile im LEU2-Fragment oder seiner Umgebung. Es kann sich dabei um Anfang oder Ende der RNAs oder um ihre Spleißstellen handeln. Für die Annahme von Spleißstellen in dieser Region spricht hauptsächlich die Analogie zur 2µmLEU2-DNA, wo ebenfalls gespleißte RNAs in diesem Bereich kartiert wurden (s. 3.2 und 5.2).

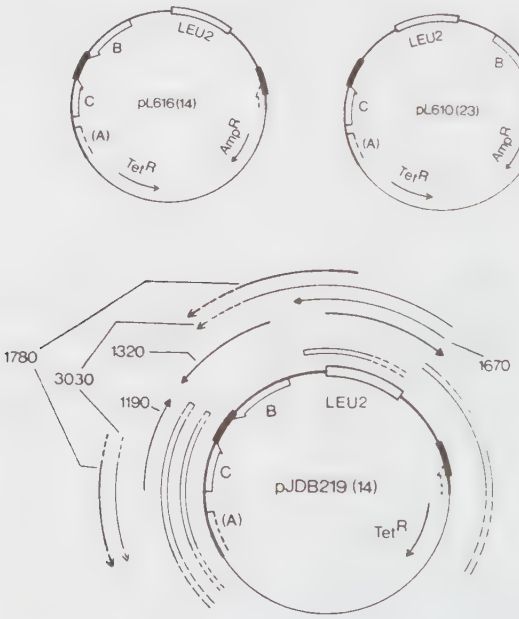


Abb.14: Rekombinantplasmide pJDB219, pL616 und pL610 und ihre Transkriptionskarte.
oben: schematische Darstellung der Plasmide pL616 (14) und pL610(23); dicke Kreislinie: 2µm-DNA; schwarze Balken: IR-Elemente; weißer Balken: LEU2-Fragment; dünne Kreislinie: bakterieller Vektor; Pfeile geben Leserahmen an. unten: Schema von pJDB219(14) (Darstellung wie oben) mit Transkriptionskarte; Pfeile geben die Lage der Transkripte an, die auch von 2µmLEU2-DNA abgelesen werden; offene Kreissegmente kennzeichnen die Bereiche, in denen die großen RNAs kartiert wurden (Einzelheiten im Text).

Das Auftreten völlig identischer Bandenmuster der Transkripte von rekombinanten 2µm-DNA-Derivaten beider Typen widersprach allen Erwartungen. Nur zwischen YT200 und YT210 gibt es Unterschiede, die sich jedoch eindeutig auf 2µmLEU2-DNA in YT200 zurückführen lassen, die in vivo durch intermolekulare Rekombination zwischen 2µm-DNA und pJDB219 entstanden ist. Daher treten dort die 1280b- und 1420b-RNAs aus dem Bereich des Leserahmens A zusätzlich auf (Abb.13A f-h und 13B u,v). Die 1780b- und 3030b-RNAs und die Transkripte zwischen 3000 und 5600b Länge bestehen aus Teilen, die von beiden Segmenten transkribiert wurden. Die codierenden Sequenzen liegen jedoch bei der einen Orientierung der Segmente auf dem gleichen DNA-Strang - für die 1780b- und 3030b-RNAs ist dies der Typ 14 - nach Inversion dagegen auf verschiedenen Einzelsträngen. Deshalb ist eine Erklärung dieser Beobachtung mit den bisher bekannten Vorgängen der Transkription und des Spleißens nicht möglich. In 5.3 wird ein Modell der Transkription von dimeren Plasmiden beschrieben, das diese Ergebnisse befriedigend erklären kann.

Über die Regulation der Gene auf 2µm-DNA läßt sich aus diesen Experimenten folgendes entnehmen. Da die Transkripte der REP-Gene in allen Stämmen vorkommen, werden diese Gene sicher nicht durch Inversion reguliert. Für das FLP-Gen gilt, daß durch die Insertion bakterieller DNA in die EcoRI-Schnittstelle entweder ein 750b großes Resttranskript der 1420b-RNA oder eine größere Fusions-RNA auftreten muß. Diese RNA läßt sich zwar nicht identifizieren, da jedoch überhaupt keine RNAs gefunden wurden, die vom Typ des Plasmids abhängen, muß auch sie von beiden Typen abgelesen werden. Deshalb kann auch für das FLP-Gen eine Regulation durch Inversion von Segmenten der 2µm-DNA ausgeschlossen werden. Nur ein Transkriptionsbereich, der kurz vor der EcoRI-Schnittstelle im S-Segment beginnt, (z.B. 1280b- oder 930b-RNA), und dessen Resttranskript in den Rekombinantplasmiden für den Nachweis in "Northern"-

Experimenten zu klein ist, könnte noch auf diese Weise reguliert werden. Diese Möglichkeit sollte in 4.4 untersucht werden, doch war es nicht gelungen, ein passendes flp-Rekombinantplasmid zu konstruieren (s. 4.1 und 4.4).

4. Ergebnisse zur FLP-abhängigen Rekombination

4.1 Konstruktion der Plasmidreihe pG53

Bei der Untersuchung der Frage, ob in den Rekombinantplasmiden, abhängig von der Form der 2µm-DNA, unterschiedliche RNAs transkribiert werden, war nur noch die Umgebung der EcoRI-Schnittstelle im S-Segment ungeklärt geblieben. Um auch in diesem Bereich die Transkription der beiden Formen der 2µm-DNA getrennt untersuchen zu können, mußten neue Rekombinantplasmide konstruiert werden. Sie sollten in cir°-Hefestämmen ihren Typ nicht mehr durch Inversion ändern können, aber die Umgebung der EcoRI-Schnittstelle im S-Segment weitgehend intakt enthalten.

Diese Forderung zu erfüllen, war nicht einfach, da nur wenig über die Interkonversion der 2µm-DNA bekannt war. Es ist sicher, daß ein genetisches Element FLP dafür verantwortlich ist, das auf der 2µm-DNA im Bereich dieser EcoRI-Schnittstelle liegt (Broach & Hicks, 1980). Broach und Hicks (1980) haben vorgeschlagen, daß dieses FLP-Element ein Gen mit diffusiblem Produkt ist, welches vom Leserahmen A der 2µm-DNA codiert wird. Folgt man dieser Annahme, die später noch ausführlich diskutiert wird, so sollte es möglich sein, nicht-invertierende Plasmide zu konstruieren, indem man den Leserahmen A durch Insertion von Fremd-DNA zerstört. Dafür sollte sich besonders die einzige SphI-Schnittstelle der 2µm-DNA eignen, da sie den Leserahmen A unmittelbar nach dem Startcodon abtrennt von seinem 5'-nicht-codierenden Bereich, dem mutmaßlichen Promotor von FLP (Abb.15 u. 17).

Als Fremd-DNA für die Insertion bot sich der bakterielle Vektor pBR325 an, der im Tet^R-Gen ebenfalls eine einzelne SphI-Stelle trägt (Bolivar, 1978). Damit die Rekombinantplasmide in Hefe selektierbar sind, wurde zu ihrer Konstruktion 2µmLEU2-DNA verwendet, die von Frau Erhart aus

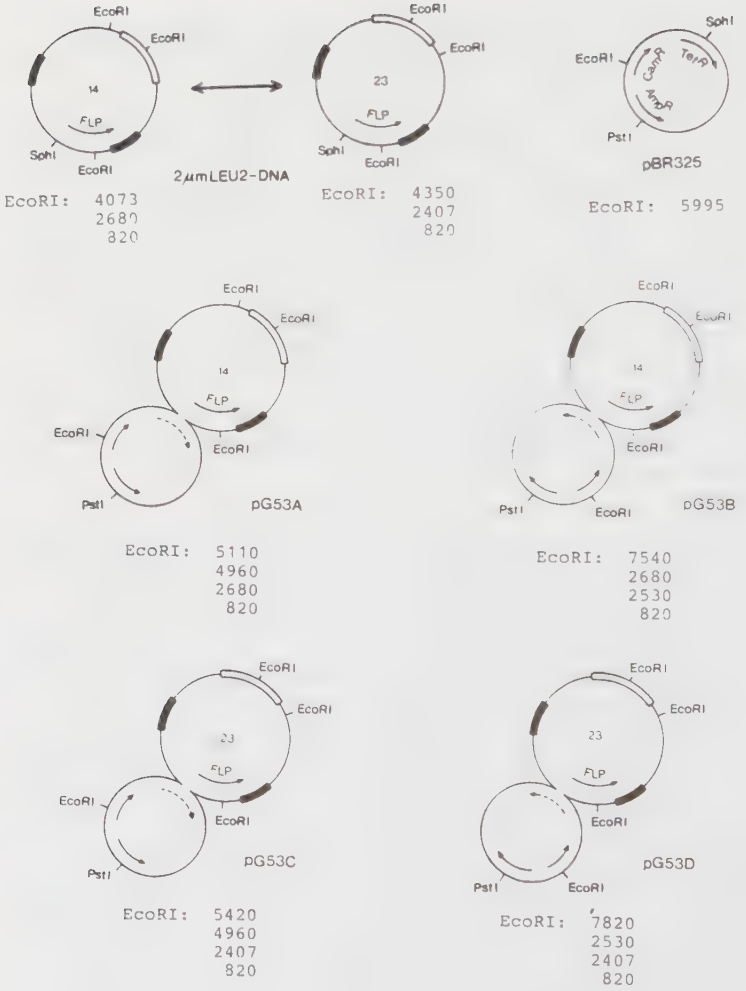


Abb.15: Schematische Darstellung von Plasmiden der pG53-Reihe und ihrer Ausgangsplasmide. 2μmLEU2-DNA (großer Kreis) mit IR-Elementen (schwarze Balken) und LEU2-Gen (weißer Balken); der Pfeil gibt die Lage des vermuteten FLP-Gens an(s.Text); kleiner Kreis: pBR325 mit Amp-, Cam- und Tet-Resistenzgenen (Pfeile) bzw. zerstörtem Tet^R-Gen (unterbrochener Pfeil); die Länge der EcoRI-Restriktionsfragmente ist in Basenpaaren angegeben.

dem Hefestamm YT6001 isoliert worden war (Erhart & Hollenberg, 1981). In 2µmLEU2-DNA aus Hefe liegen immer beide Formen, Typ 14 und 23, gemeinsam vor. Da zusätzlich bei der Insertion von pBR325 zwei Orientierungen möglich sind, erwartet man bei dieser Konstruktion die vier Plasmide pG53A bis pG53D (Abb.15).

pG53A und B enthalten die 2µmLEU2-DNA in Form 14, pG53C und D in Form 23. Die beiden Plasmide mit gleicher Form der 2µmLEU2-DNA unterscheiden sich jeweils voneinander durch die Lage der pBR325-Sequenzen relativ zur 2µm-DNA. In pG53A und C liegt der Promotor mit dem Hauptteil des Tet^R-Gens in einigem Abstand vor dem Leserahmen C. pG53B und D enthalten diese Sequenzen dagegen unmittelbar vor dem Leserahmen A. Auf diesen wesentlichen Unterschied werde ich später zurückkommen (s. 4.3).

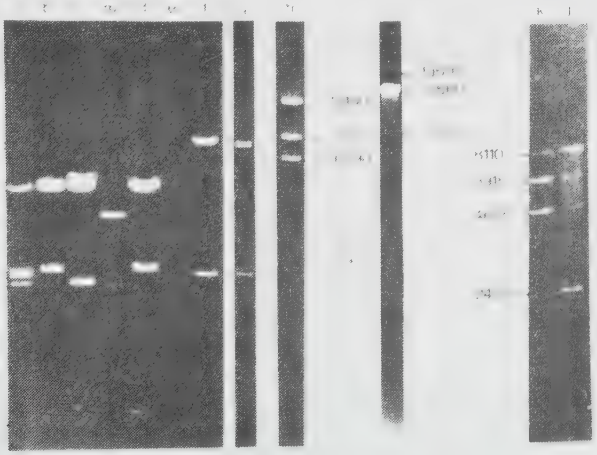


Abb.16: Inversion von 2µm-Sequenzen in E.coli. Restriktionsfragmente der Plasmide aus E.coli im Agarose-Gel angefärbt mit Ethidiumbromid. a-f: Minilysate der Leu^+-Transformanten geschnitten mit EcoRI; a: pG53XY; b,d: pG53A; c: pG53C; e: pBR325; f,g: pG53BD; m: Marker; h: pG53XY geschnitten mit AvaI; i: pG53BD geschnitten mit BamHI; k,l:pK21-TF (s. Abb.19) geschnitten mit EcoRI.

Zur Herstellung der Plasmidreihe pG53 wurde 2µmLEU2-DNA und pBR325 mit SphI geschnitten und dann zusammen ligiert. Mit dem Ligationsgemisch wurden kompetente Zellen des E.coli-Stammes JA221 ($recA^-$ $leuB^-$ $trpE^-$) transformiert. Die Transformanten mit den gesuchten Plasmiden waren Leu^+, Amp^R, Cam^R und Tet^S. Ihre DNA wurde aus Minilysaten isoliert und durch EcoRI-Spaltung und Gelelektrophorese analysiert (Abb.16).

Die Auswertung dieses Klonierungsexperiments ergab, daß die Transformanten Plasmide vom Typ pG53A bis D enthielten. Bemerkenswert war jedoch, daß pG53B und D immer gemeinsam zu je etwa 50% in einem Klon auftraten, während pG53A oder C immer getrennt vorkamen (Abb.16, Tab.3). Die weitere Untersuchung zeigte, unter anderem durch Rücktransformation der Plasmide pG53B und D aus diesen Klonen, daß beide Plasmide sich weder biologisch noch physikalisch voneinander trennen lassen. In Analogie zur 2µm-DNA werden sie im folgenden als ein Plasmid pG53BD bezeichnet, welches in den beiden Formen B (14) und D (23) auftritt.

Plasmid	Transformanten
pG53A	5
pG53C	4
pG53BD	12
pG53BD + pBR325	1
pG53XY	3

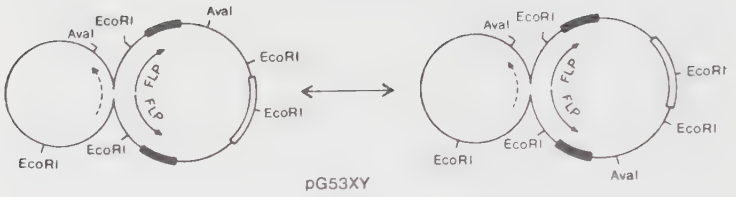
Tab.3: Häufigkeit der Plasmidtypen.
Anzahl der Transformanten mit verschiedenen Plasmiden der pG53-Reihe; 25 Leu^+-Transformanten wurden getestet.

Das Plasmid pG53BD wird von BamHI nur einmal geschnitten. Die gereinigte Plasmid-DNA zeigte jedoch nach BamHI-Spaltung neben einer Hauptbande bei 13,5 kb zwei sehr schwache Banden bei 19,5 und 7,7kb (Abb.16i) Sie können erklärt werden als die Spaltprodukte eines dimeren pG53BD-Plasmids. Die Dimerisierung ist über die IR-Sequenzen abgelaufen und zwar über die sich nicht entsprechenden (IR1/IR2 oder IR2/IR1). Vermutlich existiert neben diesem Kopf-an-Kopf-Dimeren auch das andere mit Schwanz-an-Kopf-Konfiguration. Dieses kann nicht nachgewiesen werden, da es alle Fragmente mit den Monomeren gemeinsam hat. Derartige Dimere sind in $recA^-$-Stämmen ungewöhnlich. Es liegt deshalb nahe, sie mit dem Auftreten der beiden Formen B und D in pG53BD in Verbindung zu bringen.

4.2 Das Plasmid pG53XY

Zusätzlich zu den bereits besprochenen Plasmiden pG53A, C und BD findet man unter den Transformanten in 4.1 auch solche, die ein Plasmid mit einem unerwarteten EcoRI-Spaltmuster enthalten (a in Abb.16, Tab. 3). Nach Kartierung mit weiteren Restriktionsenzymen ließ sich dieser Plasmidtyp pG53XY erklären. Das Plasmid pG53XY (Abb.17) enthält die vollständige L-Region von 2µmLEU2-DNA und die beiden IR-Bereiche. Der Teil der S-Region zwischen SphI-Schnittstelle und IR1 mit dem Leserahmen C ist deletiert. Stattdessen befindet sich dort eine invertierte Duplikation des anderen Teils der S-Region mit dem Leserahmen A. Diese "aberrante" 2µmLEU2-DNA mit zwei A-Rahmen ist über die SphI-Schnittstelle in pBR325 integriert, so daß ein Leserahmen wie in pG53BD in Nachbarschaft zum Tet^R-Promotor gerät, der andere nicht. Die exakte Deletion/Duplikation zwischen SphI-Schnittstelle und IR1 läßt nicht die Klonierung eines "aberranten" 2µmLEU2-Moleküls vermuten, sondern ist nur durch Rekombination in E.coli zu erklären.

A



EcoRI:	4960	AvaI:	10100	EcoRI:	4960	AvaI:	7270
	2680		3470		2680		6290
	2530				2530		
	2407				2407		
	820				820		

B

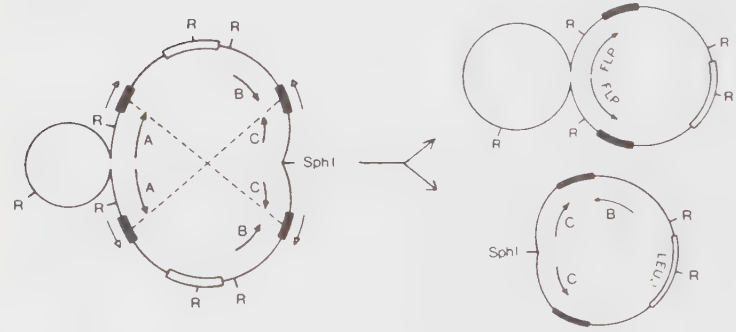


Abb.17: pG53XY und seine Entstehung.
A: Schematische Darstellung der beiden Formen von pG53XY (Darstellung wie in Abb.15).
B: Schema des im Ligationsgemisch entstandenen, postulierten Primärplasmids (links) und der durch Rekombination über seine direkten IRs entstehenden Zerfallsprodukte: pG53XY und ein vektorloses Plasmid; Darstellung wie in Abb.15; nur die EcoRI-Schnittstellen (R) sind eingetragen; Pfeile innen geben die 3 großen Leserahmen A (FLP), B und C an; die Pfeile außen an den IR-Elementen geben eine willkürlich festgesetzte Orientierung an; die beiden Paare direkter IRs sind durch gestrichelte Linien verbunden.

Zur Entstehung des Plasmids pG53XY wird deshalb angenommen, daß zwei mit SphI linearisierte 2µmLEU2-Moleküle über diejenigen SphI-Enden miteinander ligiert wurden, die den Leserahmen C tragen. Das entstandene lineare Dimere wurde über die beiden anderen Enden, die den Leserahmen A tragen, in pBR325 integriert (Abb.17B).
Im so entstandenen, hypothetischen Primärplasmid lassen sich aus seinen vier IR-Elementen zwei Paare als direkte (IR1/IR2' und IR2/IR1') oder vier Paare als invertierte Duplikation (z.B. IR1/IR2 oder IR1/IR1') bilden. Dieses Plasmid ist auf Grund der direkten Duplikationen instabil und zerfällt durch Rekombination über ein Paar direkter Duplikationen. Nur eines der Zerfallsprodukte enthält einen bakteriellen Vektor. Es bleibt daher in E.coli erhalten und wurde als pG53XY aufgefunden. Das andere Produkt geht mangels Replikon verloren und mit ihm beide Kopien des Leserahmens C (Abb.17B).

In pG53XY sind die beiden Leserahmen A invertiert zueinander angeordnet, so daß jeder der beiden zusammen mit der angrenzenden IR-Sequenz eine 1685bp große invertierte Duplikation zum anderen darstellt. Da EcoRI und HindIII darin jeweils einmal schneiden, ergibt die Spaltung von pG53XY mit diesen Enzymen ein Bandenmuster, welches auf eine Population identischer Plasmide schließen läßt (Abb.16a). AvaI spaltet dagegen jeweils einmal im L-Segment und in pBR325, also nur in nicht-duplizierten Bereichen (Abb.17A). Diese Spaltung zeigt, daß das Plasmid auch etwa zur Hälfte mit invertiertem L-Segment vorliegt (Abb.16h). Es handelt sich also wie bei pG53BD um ein Plasmid in zwei Formen. Da die Nachbarschaft der IR-Elemente verändert ist, kann man für die Typen von pG53XY die Bezeichnungen 14 und 23 von der 2µm-DNA nicht übernehmen. Sie werden x und y genannt.

4.3 Expression der FLP-Aktivität in E.coli

Da alle bisher bekannten Rekombinantplasmide der 2µm-DNA in E.coli nur in einer Form vorliegen, waren die Ergebnisse mit pG53BD und XY unerwartet. Sie lassen sich auf einfache Weise nur so erklären, daß das Gemisch der beiden Plasmidtypen in der transformierten E.coli-Zelle entsteht, nachdem sie DNA eines Typs aufgenommen hat. Beide Formen der Plasmide müssen also in E.coli ineinander überführbar sein. Diese Interkonversion erfolgt sicher durch Inversion über die IR-Elemente, wahrscheinlich analog zur FLP-abhängigen Rekombination der 2µm-DNA in Hefe (Beggs, 1978; Broach et al., 1982). Man kann deshalb von einem Flp^+-Phänotyp dieser E.coli-Stämme sprechen. Da auch die nahe verwandten Plasmide pG53A und C in E.coli nicht rekombinieren, muß diese Eigenschaft auf eine Besonderheit der Struktur von pG53BD und XY zurückzuführen sein.

Wie bereits erwähnt, liegt in beiden Plasmiden der Tet^R-Promotor mitsamt einem Stück des Strukturgens unmittelbar vor dem Leserahmen A der 2µm-DNA, so daß beide Sequenzen als ein gemeinsames Transkript abgelesen werden können (Abb.18). Das Tet^R-Gen von pBR325 enthält zwei überlappende Leserahmen A-179 und C-338, die für verschiedene Tet^R-Proteine codieren (Sutcliffe, 1978; Hillen & Schollmeier, 1983). Im Überlappungsbereich dieser Leserahmen liegt die SphI-Schnittstelle, über die die Verknüpfung stattgefunden hat. Aus den Sequenzdaten des Tet^R-Gens (Sutcliffe, 1978) und der 2µm-DNA (Hartley & Donelson, 1980) ergibt sich, daß die Leserahmen A-179 des Tet^R-Gens und A der 2µm-DNA dabei in Phase fusioniert wurden. Es entsteht daher ein durchgehendes offenes Leseraster, das unter der Kontrolle des Tet^R-Promotors steht, während der Leserahmen C-338 20bp nach der Fusionsstelle mit einem Stopcodon in der 2µm-Sequenz endet.

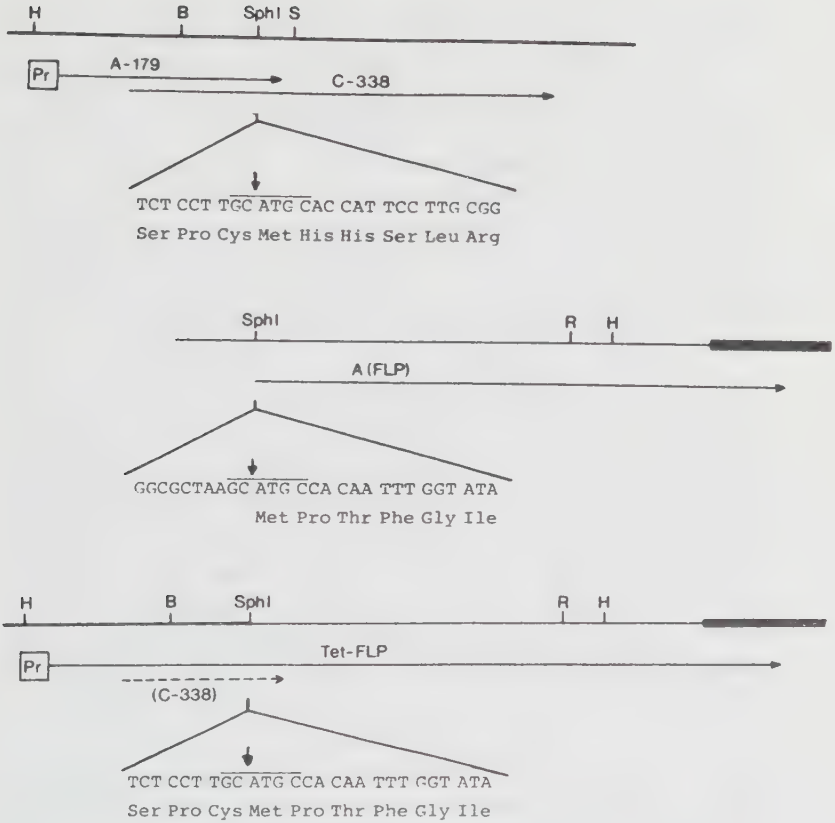


Abb.18: Schema des Tet-FLP-Gens
Oben: Tet^R-Gen in pBR325 (dicke Linie) mit den Schnittstellen HindIII (H), BamHI (B), SphI und SalI (S); Pr: Tet^R-Promotor; die beiden Pfeile geben die Leserahmen A-179 und C-338 an (s. Text); darunter ist die DNA-Sequenz im Bereich der SphI-Schnittstelle gezeigt mit der Proteinsequenz, die sich aus A-179 ergibt (Linie über DNA-Sequenz: Erkennungssequenz von SphI; Pfeil: Schnittstelle).
Mitte: Leserahmen A der 2µm-DNA (dünne Linie) mit IR2 (schwarzer Balken) und den Schnittstellen SphI, EcoRI (R) und HindIII (H); Pfeil: Leserahmen A; darunter DNA- und Proteinsequenz im Bereich der SphI-Schnittstelle (s. oben).
Unten: Fusionierter Leserahmen des Tet-FLP-Gens (Darstellung wie oben); gestrichelter Pfeil: unterbrochener Leserahmen C-338; darunter DNA- und Proteinsequenz der Fusionsprodukte.

Die Expression des fusionierten Leserahmens sollte ein hybrides Protein aus 582 Aminosäuren ergeben. Einem N-terminalen Bereich von 158 Aminosäuren des Tet^R-Proteins folgen die 423 Aminosäuren des Leserahmens A. Vom Tet^R-Protein her trägt der N-Terminus eine Sequenz von 29 überwiegend hydrophoben Aminosäuren, die als Signalpeptid für den Transport fungieren und abgespalten werden könnten (Sutcliffe, 1978; Blobel & Dobberstein, 1975). Für das Fusionsprotein ist deshalb eine mit der inneren Membran assoziierte Lage wahrscheinlich, ähnlich der des intakten Tet^R-Proteins (McMurry et al., 1980).

E.coli-Zellen, die das Plasmid pG53BD mit dem beschriebenen fusionierten Leserahmen enthalten, haben den Phänotyp Flp^+. Deshalb muß dieser Leserahmen in E.coli exprimiert werden und sein Produkt eine Inversionsaktivität vermitteln. Da die Information für diese FLP-Aktivität nur aus dem Leserahmen A der 2µm-DNA kommen kann, ist damit bewiesen, daß dieser Leserahmen A der codierende Bereich des FLP-Gens ist. Der fusionierte Leserahmen unter Transkriptionskontrolle des Tet^R-Promotors wird Tet-FLP-Gen genannt.

Für die Inversionsaktivität des 67kD großen Fusionsproteins muß der 48,6kD große Bereich am C-Terminus, der vom Leserahmen A der 2µm-DNA codiert wurde, seine ihm eigene Sekundär- und Tertiärstruktur annehmen können. Es ist unbekannt, in wieweit der Tet^R-Anteil und insbesondere der hydrophobe N-Terminus mit seinen Konsequenzen für die Lokalisation des Proteins diese Aktivität beeinflußt. Die gesamte FLP-Aktivität in der E.coli-Zelle muß ausreichen, damit bei der Probenahme etwa 30 Generationen nach der Transformation beide Formen des Plasmids gleich häufig sind. Es ist nicht bekannt, ob das Fusionsprotein noch die Funktion des 21kD-Tet^R-Proteins erfüllen kann. Es enthält etwa 89% des ganzen Leserahmens A-179, diesen Klonen fehlt jedoch das 40kD-Tet^R-Protein des Leserahmens C-338 zur Tetracyclin-Resistenz.

In einem Derivat von pG53BD, dem Plasmid pG53BD-K21 (Abb.19, s. 4.6), wurde durch XmaIII-Spaltung die gesamte pBR325-Sequenz entfernt bis auf das Tet-FLP-Gen und ein davor liegendes DNA-Stück von etwa 115bp Länge. Das resultierende Plasmid pK21-TF entspricht weitgehend pK21 (Abb.23A,Seite 83),enthält jedoch ein intaktes Tet-FLP-Gen (Abb.19). Im Gegensatz zu pK21 invertiert dieses Plasmid wie erwartet in E.coli. Etwa 30 Generationen nach der Transformation sind jedoch beide Formen des Plasmids noch nicht gleich häufig (Abb.16 k,l). Durch diese Inversion von pK21-TF konnte gezeigt werden, daß die FLP-Aktivität vom Tet-FLP-Gen ausgeht und nicht von anderen Bereichen der pBR325-DNA.

In Hefe war die Mitwirkung anderer, von der 2µm-DNA codierter Proteine an der Inversion ausgeschlossen worden, doch wurde vermutet, daß weitere Produkte chromosomaler Gene dafür benötigt werden (Broach et al., 1982). Im Gegensatz dazu weist die FLP-Aktivität in E.coli vor einem völlig anderen genetischen Hintergrund auf die Möglichkeit hin, daß die spezifische Rekombination der 2µm-DNA allein vom FLP-Protein durchgeführt wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß in Hefe weitere Proteine daran beteiligt sind, deren Funktion in E.coli von bakteriellen Proteinen übernommen wird.

Das Fusionsprotein kann in E.coli JA221 ($recA^-$) das recA-Protein nicht ersetzen. Dies wurde untersucht durch Vergleich der UV-Sensibilität (Maniatis, 1982) von JA221, JA221-pG53BD und einigen anderen $recA^-$- und $recA^+$-Stämmen zur Kontrolle. In diesem Test überlebte keiner der $recA^-$-Stämme die 10sec-Bestrahlung, während die $recA^+$-Stämme noch nach einer Dauer von 60sec unverändert wuchsen. Damit ist gezeigt, daß auch JA221-pG53BD noch die für $recA^-$-Stämme typische hohe UV-Sensibilität hat.

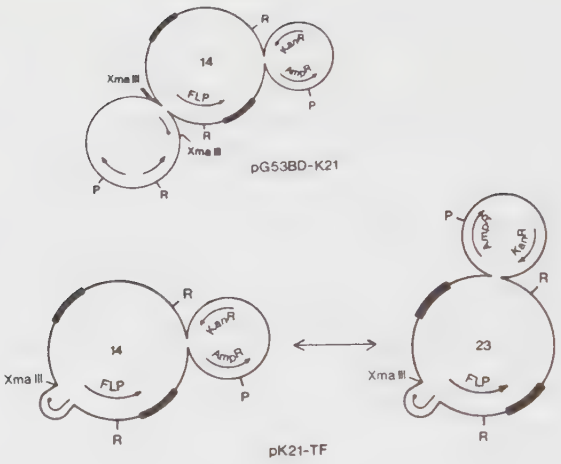


Abb.19: Das FLP-Plasmid pK21-TF.
Oben: Ausgangsplasmid pG53BD-K21 (s. 4.6) mit den bakteriellen Vektoren pBR325 (links unten) und pACYC177 (rechts); durch XmaIII-Spaltung entsteht daraus pK21-TF. Unten: Schema der beiden Formen von pK21-TF; die Deletion durch XmaIII hat von pBR325 nur den Teil mit dem Tet^R-Promotor zurückgelassen (Anhängsel links unten); EcoRI-Fragmente von Typ 14: 5915, 4605; Typ 23: 8110, 2407 (in bp).

Alle Plasmide der pG53-Reihe enthalten in ihrem pBR325-Teil zwei invertierte Duplikationen von 482bp Länge (Prentki et al., 1981). Eine Inversion über diese Sequenzen sollte zu EcoRI-Fragmenten von 5290, 4090 und 3810bp führen, die nirgends beobachtet werden konnten (s. z.B. Abb.16).

Zusammenfassend läßt sich die FLP-Aktivität in E.coli auf die Fusion des Leserahmens A an den Tet^R-Promotor zurückführen. Obwohl dieses Fusionsprotein nicht nachgewiesen wurde, ist seine Existenz durch die Ergebnisse in 4.1 und 4.2 sehr wahrscheinlich. Dies ist der erste Beweis für das Postulat eines von Leserahmen A codierten FLP-Proteins (Broach & Hicks, 1980).

4.4 Rekombination der Plasmide pG53A, C und BD in Hefe

Der cir°-Hefestamm YT6-2-1L ($leu2^-$ $his3^-$) wurde mit den Plasmiden pG53A, C und BD getrennt transformiert. Aus einzelnen Leu^+-Transformanten wurde Plasmid-DNA isoliert, EcoRI- bzw. HindIII-geschnitten und nach Southern (1975) analysiert. In den Transformanten lagen sowohl pG53A und C gemeinsam vor wie auch beide Formen von pG53BD (Abb.20). Diese Plasmide führen also in cir°-Hefe zum Flp^+-Phänotyp. Dabei scheint kein Unterschied zu bestehen zwischen den Plasmiden pG53A und C einerseits, in welchen vor dem FLP-Strukturgen DNA mit der Anti-Tet^R-Sequenz liegt, und dem pG53BD andererseits mit dem Tet-FLP-Gen. Die FLP-Aktivität aller Plasmide dieser Reihe macht sie unbrauchbar für die beabsichtigte Untersuchung der Transkripte von definierten Typen der 2µm-DNA.

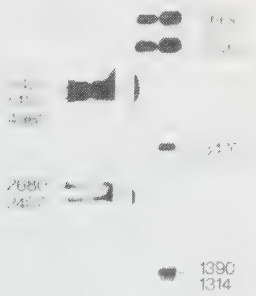


Abb.20: Inversion der pG53-Plasmide in cir°-Hefe.
Autoradiogramme der EcoRI- (a,b) bzw. HindIII-gespaltenen (c,d) Minilysate von YT6-2-1L transformiert mit pG53-Plasmiden; a: pG53A; b: pG53C; c,d: pG53BD.

Die Insertion von pBR325 vor dem Startcodon des Leserahmens A beeinflußt demnach in Hefe die Expression des FLP-Gens nicht. Dafür bietet sich einmal die Erklärung an, daß sein Promotor hinter diesem ATG-Codon liegt. In Hefe würde dann das FLP-Gen in allen diesen Plasmiden unter der Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert. Dies kann entweder bedeuten, daß das Strukturgen erst bei einem späteren Startcodon beginnt oder der Promotor im Strukturgen liegt. Die erste Annahme wird etwas gestützt durch das Auffinden eines 37kD-Proteins aus dieser Region in E.coli-Minizellen (Hollenberg, 1978), welches für das 48,6kD-Protein des ganzen Leserahmens A zu klein ist. Andererseits kann die Expression des FLP-Gens in Hefe auf Promotoren im Tet^R-Gen zurückzuführen sein. Dafür bietet sich in pG53BD der Tet^R-Promotor selbst an. Für die Plasmide pG53A und C müßte angenommen werden, daß die Transkription an einer Sequenz des Anti-Tet^R-Strangs beginnt. Ein entsprechender Bereich, der in Hefe als Promotor wirken kann, liegt zwischen der BamHI- und SalI-Schnittstelle auf dem Anti-Tet^R-Strang (Zitomer, pers. Mitt.). Eine Entscheidung zugunsten einer dieser Möglichkeiten ist mit dem jetzigen Stand der Kenntnisse nicht möglich.

4.5 Test der FLP-Rekombinationsaktivität in vitro

Um die in vivo beobachtete FLP-Aktivität biochemisch näher charakterisieren zu können, sollte versucht werden, sie in vitro im Extrakt der pG53-haltigen E.coli-Zellen nachzuweisen. Der Test wurde ähnlich dem von Potter und Dressler (1978) durchgeführt, die damit in vitro die Aktivität des allgemeinen Rekombinationssystems von E.coli nachweisen konnten. Das in den Zellen enthaltene Plasmid wurde aus dem Lysat durch 30minütige Zentrifugation bei 57000xg entfernt. Diesem Zellextrakt wurde neben $MgCl_2$, ATP, den anderen rNTPs, allen dNTPs

sowie Pyridin-Coenzymen und Phosphoenolpyruvat auch ein Testplasmid, meist BTYP-1, zugesetzt. Der Nachweis der Rekombinationsprodukte sollte durch Hybridisierung des EcoRI-Bandenmusters nach Southern (1975) erfolgen.

Neben solchen aus JA221 zur Kontrolle wurden Extrakte aus JA221-pG53BD und -pG53XY untersucht. Die von invertiertem BTYP-1 erwarteten Banden von 4416 und 2407bp traten nach EcoRI-Abbau nicht auf (Abb.21). Auch die Variation von Puffer und Ionenstärke sowie eine Vorinkubation des Zell-Lysats mit einem milden Detergens zum Ablösen des eventuell membrangebundenen FLP-Proteins ergab keine anderen Resultate. Nur in einem Fall, in dem pK21 (s. 4.6) als Testplasmid und andere Reaktionsbedingungen nach Zubay et al. (1970) verwendet wurden, war neben einer weiteren nicht erklärbaren Bande entsprechend ca. 10kb eine 7,5kb-Bande aufgetreten, die von invertiertem pK21 herrühren könnte (Abb.21h). In diesem Ansatz war jedoch noch etwas endogenes pG53XY enthalten. Dieses Ergebnis läßt zwar in vitro-Rekombination vermuten, doch bleibt unklar, in wieweit die pG53XY-DNA diese Reaktion durch intermolekulare Rekombination direkt beeinflußt haben könnte (s. 4.6.1).

Die Interpretation dieser Experimente wurde sehr erschwert durch drei intensive DNA-Banden entsprechend Fragmenten von etwa 6, 7,5 und 12kb, die zum Teil nach nochmaliger Phenolextraktion verschwanden (Abb.21). Sie haben wahrscheinlich nichts mit Rekombination zu tun, da sie auch einmal im Kontroll-Lysat auftraten.

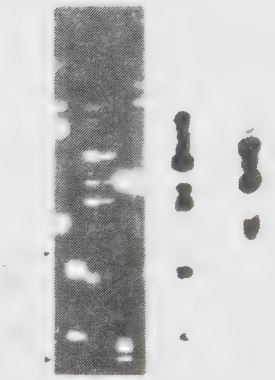


Abb.21: in vitro-Test der FLP-Aktivität. Rekombinationstest wie in 2.24 beschrieben; Aliquots der EcoRI-gespaltenen Ansätze in Agarose-Gelen aufgetrennt; a-f: Anfärbung mit Ethidiumbromid; g,h: Autoradiogramme nach Southern-Transfer, hybridisiert mit Testplasmid; a,b,e,f: Kontrollen.
a: BTYP-1, ungespalten;
b: BTYP-1, EcoRI-gespalten;
c,d: 0,4 OD_{280} Lysat von JA221-pG53BD mit 4µg BTYP-1 in 30µl unter Bedingungen nach Potter & Dressler (1978) 5h bei 30°C inkubiert; EcoRI-gespalten;
e: pG53BD, EcoRI-gespalten;
f: pG53BD, ungespalten; g: wie c; h: 1,8 OD_{280} Lysat von JA221-pG53XY mit 6µg pK21 in 40µl unter Bedingungen nach Zubay et al. (1970) 5h bei 30°C inkubiert; EcoRI-gespalten. Für a-g sind die EcoRI-Fragmente von BTYP-1 (4073, 3857 und 2750bp) und die ungefähren Längen der drei großen Banden angegeben; Pfeile markieren die Lage der gesuchten Banden von invertiertem BTYP-1; in h ist die 7500bp-Bande bezeichnet, die auf invertiertes pK21(23) hindeutet.

Da bekannt ist, daß der Tet^R-Promotor in pBR322-Derivaten nur eine schwache Transkriptionsaktivität besitzt, ist eine geringe Kopienzahl des Tet-FLP-Proteins im Lysat die einfachste Erklärung für die fehlende Inversion in den meisten Proben. Deshalb wurde das Feld der in vitro-Tests ohne eindeutiges Ergebnis verlassen. Es wird von Herrn Kleinhans versucht, einen stärkeren bakteriellen Promotor vor das FLP-Gen zu setzen und die Versuche damit später zu wiederholen.

4.6 Koexistenz von pK21 und pG53-Plasmiden

4.6.1 Intermolekulare Rekombination

In den in vitro-Experimenten war ein eindeutiger Nachweis der Rekombination nicht gelungen. Um diese Reaktion trotzdem näher charakterisieren zu können und insbesondere die Wirkung von FLP in trans nachzuweisen, wurden die folgenden Experimente in vivo durchgeführt.

Für die Inversion der 2µm-DNA in Hefe nehmen praktisch alle Autoren an, daß sie ganz überwiegend durch intramolekulare Rekombination entsteht (s. z.B. Broach, 1982). Geht man davon aus, daß dies auch für die analoge Reaktion in E.coli gilt, so wäre die trans-Wirkung bewiesen, wenn ein anderes, normalerweise in E.coli nicht-invertierendes 2µm-Derivat (flp) durch die Gegenwart eines aktiven FLP-Gens zur Inversion gebracht werden könnte. Nimmt man stattdessen einen intermolekularen Verlauf an, müßte ein Segmentaustausch zwischen heterologen Plasmiden beobachtet werden können (s. Abb.23B). In diesem Fall könnte theoretisch auch eine FLP-Aktivität vorliegen, die ausschließlich in cis wirkt.

Für dieses Experiment mußte ein geeignetes flp-Testplasmid mit dem Plasmid pG53BD oder XY in E.coli zusammengebracht werden. Sofern auf beide Plasmide getrennt selektiert werden kann, ist dies auf dem Wege der "Supertransformation" eines pG53-Stammes mit dem Testplasmid oder durch "Cotransformation" von E.coli JA221 mit beiden Plasmiden möglich. Dieses Testplasmid sowie die gesuchten Rekombinationsprodukte müssen in Minilysaten durch einfache Spaltung mit Restriktionsenzymen vor dem Hintergrund des pG53-Plasmids nachweisbar sein. Das Plasmid pK21 ist als Testplasmid für diese Untersuchung gut geeignet. Es enthält die 2µm-DNA in Form 14 und in deren

HpaI-Schnittstelle über BamHI-Linker das bakterielle Plasmid pACYC177 (Chang & Cohen, 1978) integriert (Abb.23A) (Reipen, 1982). Da es ein Kanamycin-Resistenzgen trägt, kann man mit Kanamycin und Chloramphenicol gleichzeitig auf pK21 und pG53BD selektieren. Beide Plasmide sind in E.coli kompatibel, da alle aus der pG53-Reihe das ColE1-Replikon tragen, während pK21 das Replikon aus dem Miniplasmid p15A enthält (Chang & Cohen, 1978).

Die Supertransformation des Stammes E.coli JA221-pG53BD mit pK21(14) erfolgte mit ähnlicher Frequenz wie die Transformation von E.coli JA221. Die EcoRI- oder HindIII-gespaltenen Minilysate von allen 16 untersuchten Klonen ergaben sehr ähnliche Muster mit vielen Banden (Abb.22). Die stärksten ließen sich wie erwartet den Plasmiden pG53BD und pK21(14) zuordnen. Alle anderen Banden wurden durch vergleichende Auswertung der EcoRI- und HindIII-Spaltung eindeutig bestimmt. Invertiertes pK21(23) konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Nur in wenigen Proben war nach HindIII-Spaltung eine äußerst schwache Bande bei etwa 6,5kb zu sehen, die auf pK21 vom Typ 23 hindeuten könnte (Abb.22 l-p).

In allen Proben trat eine relativ kräftige, unerwartete EcoRI-Bande von etwa 11kb auf (Abb.22 b-h), Das zugehörige DNA-Fragment läßt sich nur als Teil eines neuen Plasmids erklären, das durch intermolekulare Rekombination zwischen pG53BD und pK21 entstanden ist. In Abb.23B ist als Beispiel ein Weg dargestellt, bei dem aus den beiden Plasmiden in Form 14 die Produktplasmide in Form 23 entstehen können. Dabei wird durch ein erstes intermolekulares Rekombinationsereignis über IR2 von pG53BD(14) und IR1 von pK21(14) ein Kointegrat beider Plasmide gebildet (Integration). Es enthält die IR-Sequenzen viermal. Durch intramolekulare Rekombination über eines der vier Paare invertiert angeordneter IR-Elemente können

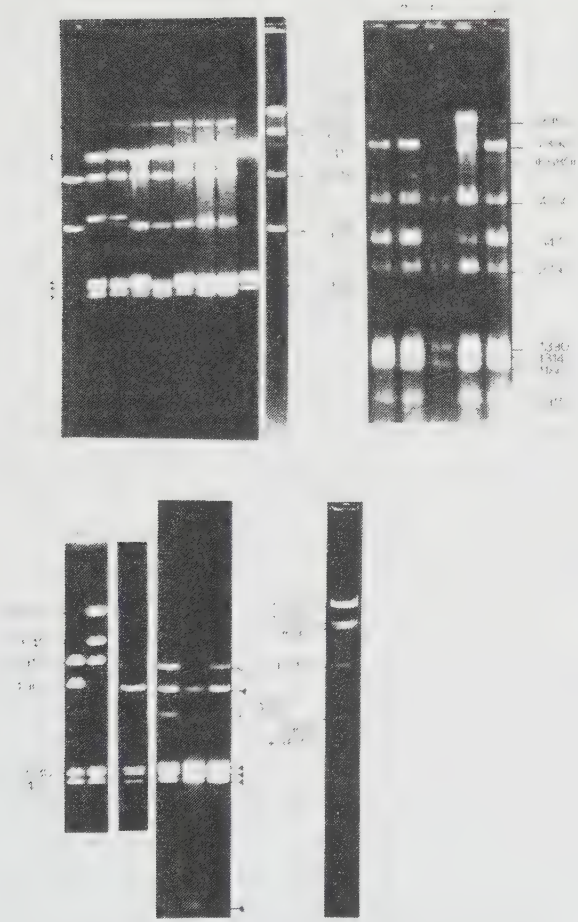


Abb.22: Plasmid-DNA aus E.coli-Minilysaten mit koexistentem pG53-Plasmid und pK21.
a: pK21, EcoRI-geschnitten; b-h: Supertransformanten von JA221-pG53BD mit pK21(14), EcoRI-geschnitten; i: pG53BD, EcoRI-geschnitten; links sind die Banden von pG53BD durch Striche mit Dreieck, die von pK21(14) durch Striche mit Kreis markiert, die neuen Fragmente sind unterstrichen; k: Supertransformant mit starker 4350bp-EcoRI-Bande, BamHI-geschnitten (s.Text S. 86 und Abb.23D); 13,5kb: pG53BD, linear; 10,1kb: Kointegrat-Fragment; 9690bp: pG53BD-K21(14)-Frag. und Kointegrat-Frag.; 8410bp: pG53BD-K21(23)-Frag.; 6318bp: pK21-Frag.; 3900bp:

Abb.22 (Fortsetzung): pG53BD-K21(23)-Frag.; 3670bp: pK21-Frag.; 2620bp: pG53BD-K21(14)-Frag.; l,m,o,p: wie b-h, HindIII-geschnitten; n: pK21(14), HindIII-geschnitten; (6580) gibt die Lage einer seltenen, schwachen Bande an, die auf invertiertes pK21(23) hindeutet; q: analog zu pG53BD-K21 in vivo entstandenes Rekombinantplasmid pG53XY-K21, EcoRI-geschnitten; r: pG53BD-K21, EcoRI-geschnitten; s: pG53XY,EcoRI-geschnitten; t-v: Super-transformanten von JA221-pG53XY mit pK21(14), EcoRI-geschnitten; w: wie v, BamHI-geschnitten.

Segmente in diesem Kointegrat invertiert werden, oder es kann durch intramolekulare Rekombination über eines der beiden Paare direkt angeordneter IRs zerfallen. Findet dieser Desintegrationsschritt über die gleichen IR-Elemente statt wie die Integration (punktierte Linie im Kointegrat, Abb.23B), so entstehen die unveränderten Ausgangsplasmide zurück. Wird dagegen das andere Paar direkter IR-Sequenzen verwendet (gestrichelte Linié im Kointegrat, Abb.23B), werden die L- und S-Segmente der Ausgangsplasmide neu kombiniert (Segmentaustausch). Dabei gelangen im hier vorliegenden Fall die beiden Segmente mit bakteriellem Replikon (S von pG53BD und L von pK21) auf ein Plasmid. Dieses neue Plasmid mit zwei Replikons, dessen 23-Form das beobachtete 11kb-Fragment enthält, wird pG53BD-K21 genannt. Das andere Plasmid ohne bakterielles Replikon ist die bekannte 2µmLEU2-DNA. Inversion der beteiligten Plasmide kann bei der intermolekularen Rekombination auftreten, wenn wie in Abb.23B der Integrationsschritt zwischen zwei Plasmiden vom gleichen Typ über die sich nicht entsprechenden IR-Elemente abgelaufen ist oder wenn im Kointegrat invertiert wurde.

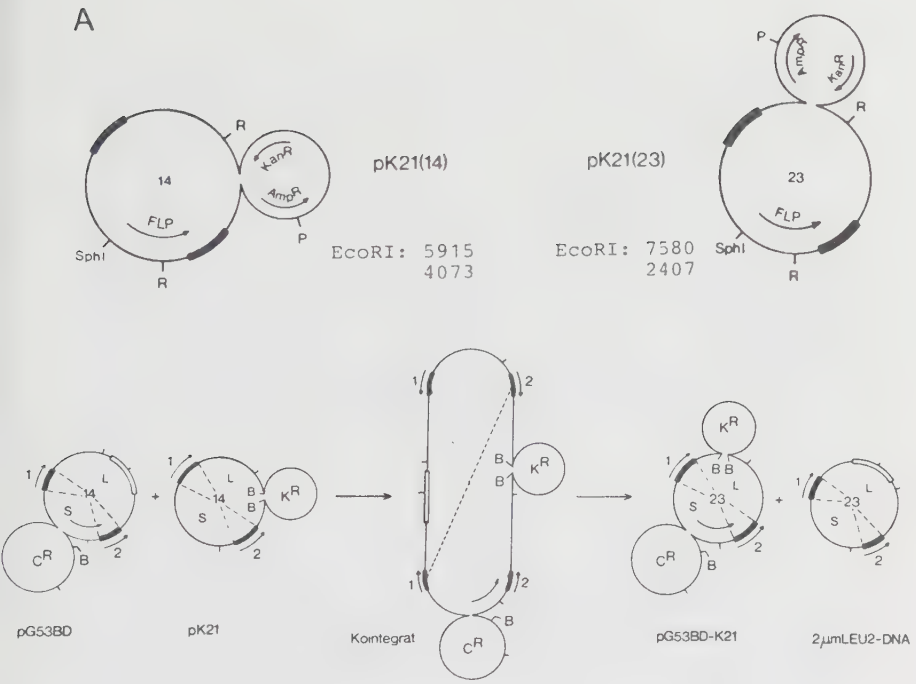


Abb.23: Intermolekulare Rekombination zwischen pG53BD und pK21(14).
A: Schematische Darstellung von pK21(14) und dem gesuchten pK21(23); großer Kreis: 2µm-DNA mit IR-Elementen (schwarze Balken); kleiner Kreis: pACYC177; die Pfeile geben die Lage des FLP-Gens und der Resistenzgene an; R,P: Schnittstellen für EcoRI bzw. PstI; die Größen der EcoRI-Fragmente beider Plasmide sind in bp angegeben.
B: Schematische Darstellung der intermolekularen Rekombination zwischen IR2 von pG53BD(14) und IR1 von pK21(14) (Darstellung wie in A bzw. Abb.17); links: die Ausgangsplasmide mit L- und S-Segmenten (L,S) durch gestrichelte Linien von den IR-Elementen abgegrenzt; IR1 und IR2 sind bezeichnet und mit einer willkürlichen Orientierung (Pfeile) versehen; die bakteriellen Vektoren sind durch ihre wichtigsten Resistenzgene (C^R = Cam^R und K^R = Kan^R) gekennzeichnet; Striche am Kreisumfang geben EcoRI-Schnittstellen an; B: BamHI-Schnittstellen; Mitte: Kointegrat; Bezeichnungen wie oben; die punktierte Linie verbindet die IRs, über deren Rekombination das Kointegrat entstanden ist; die gestrichelte Linie verbindet die IRs, über die es zerfällt; rechts: die Produktplasmide pG53BD-K21(23) und 2µmLEU2-DNA(23); Darstellung wie oben.

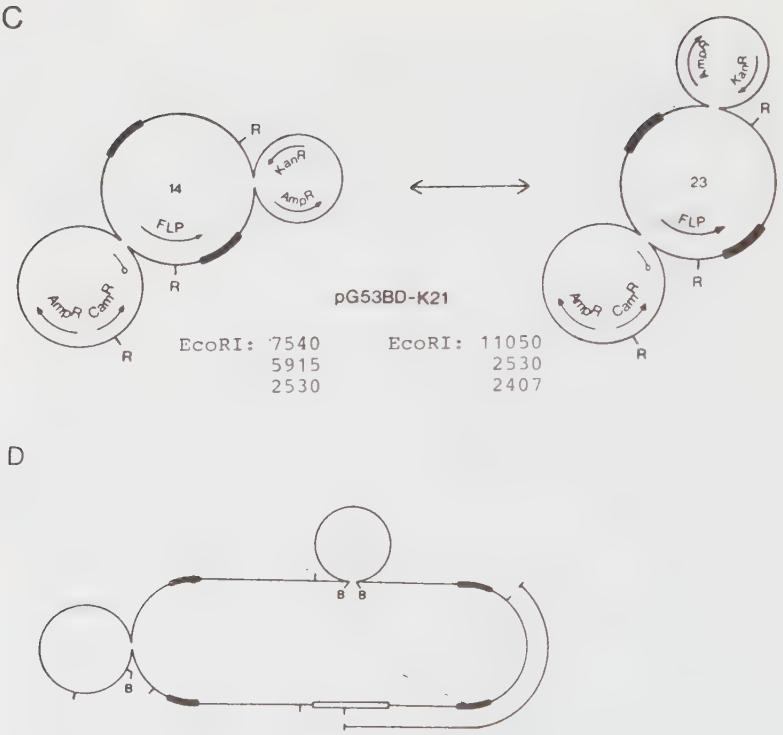


Abb.23: Intermolekulare Rekombination zwischen pG53BD und pK21(14) (Fortsetzung).
C: Schema der beiden Formen des Flp-Plasmids pG53BD-K21; Darstellung und Bezeichnungen wie in A; die beiden Teile des Tet-FLP-Gens sind durch eine punktierte Linie verbunden.
D: Schematische Darstellung des Kointegrationsplasmids mit dem 4350bp-EcoRI-Fragment (s. Text S.86); punktierte Linie verbindet die IRs, über deren Rekombination es entstanden ist; B: BamHI-Schnittstellen; EcoRI-Schnittstellen sind durch radiale Striche gekennzeichnet; das 4350bp-Fragment ist als zusätzliche Linie eingezeichnet; BamHI-Fragmente: 10200, 9690 und 3670 bp.

Das in diesem Experiment aufgetretene Plasmid pG53BD-K21 enthält das Tet-FLP-Gen und sollte deshalb invertieren können. Dies konnte in den Minilysaten nicht untersucht werden, da die Banden der anderen Form von den Plasmiden pG53BD und pK21 verdeckt wurden. Deshalb wurde das Plasmid pG53BD-K21 durch "Rücktransformation" in E.coli vereinzelt. Die Transformanten mit pG53BD-K21 unterscheiden sich durch den Phänotyp Cam^R, Kan^R und Leu^- von allen anderen. Etwa 24% der Kolonien auf der Chloramphenicol-Platte hatten diesen Phänotyp (Tab.4). Die Untersuchung dieser Klone zeigte, daß alle das Rekombinantplasmid pG53BD-K21 in einer äquimolaren Mischung der beiden Formen 14 und 23 enthielten (Abb.22r).

In einem Teil der Minilysate aus der Supertransformation von JA221-pG53BD mit pK21 war eine weitere, recht kräftige Bande von etwa 4350bp aufgetreten (Abb.22 b,c). Es könnte sich dabei um ein Fragment der 2µmLEU2-DNA(23) handeln. Wie später gezeigt wird, ist diese Bande auch in allen anderen Kolonien nachweisbar. Sie tritt dort erst in einer späteren Phase nach der Transformation schwach auf(4.6.2). Da 2µmLEU2-DNA kein bakterielles Replikon besitzt, kann sie in E.coli nicht stabil repliziert werden. Die Intensität der 4350bp-Bande gab einen Hinweis darauf, daß 2µmLEU2-DNA vielleicht in Stämmen mit pG53BD-K21 oder pK21 stabil sein könnte. Jedoch sind die Versuche fehlgeschlagen, in JA221-pG53BD-K21 und JA221-pK21 durch Supertransformation mit 2µmLEU2-DNA einen stabilen Leu^+-Phänotyp zu erzeugen (unveröffentlichte Daten). Aufgrund der Intensität der 4350bp-Bande muß daher angenommen werden, daß es sich bei ihr nicht um ein Fragment freier 2µmLEU2-DNA handelt, sondern um das Fragment eines in E.coli stabil replizierten Plasmids mit Resistenzgenen. Dafür kommt nur ein Kointegrationsplasmid in Frage.

Phänotyp	Plasmid	pG53BD + pK21		pG53XY + pK21	
von Cam-Platte:					
Cam^R Kan^R Leu^+	Kointegrate (+Cotrans-form.)	9	18%	5	14%
Cam^R Kan^R Leu^-	pG53-K21	12	24%	18	50%
Cam^R Kan^S Leu^-	pG53	29	58%	13	36%
Cam^R Kan^S Leu^-	--	0		0	
gesamt:		50		36	
von Kan-Platte:					
Kan^R Cam^R	Kointegrate+ +pG53-K21	51	47%	59	65%
Kan^R Cam^S	pK21	57	53%	32	35%
gesamt:		108		91	

Tab.4: Häufigkeit der Phänotypen unter den Rücktransformanten.
JA221 wurde transformiert mit Minilysat-DNA aus jeweils einem Supertransformanten des Stammes JA221-pG53BD bzw. XY mit pK21(14) und die Häufigkeit der verschiedenen Phänotypen unter den Rücktransformanten bestimmt; die linke Zahlenreihe in jeder Rubrik gibt die Zahl der Transformanten an, die rechte die Häufigkeit in Prozent.

Die Rücktransformanten mit dem Phänotyp Cam^R, Kan^R, Leu^+ weisen bereits auf derartige Kointegrationsplasmide hin, da ihr hoher Anteil nicht durch Cotransformation erklärt werden kann (Tab.4). Solche Kointegrationsplasmide lassen sich im Prinzip durch ihre großen BamHI-Fragmente nachweisen (Abb.23B und D). Da sie jedoch immer ein bis zwei Banden mit den anderen Plasmiden gemeinsam haben und nur in geringen Mengen vorkommen, ist ihr Nachweis in den Minilysaten schwierig (Abb.22k). Sicher vorhanden war in einigen Klonen das 10,1kb-BamHI-Fragment eines Kointegrate-Typs, bei dem pG53BD und pK21 über ihre IR1-Elemente miteinander rekombiniert hatten. Am Bandenmuster ist nicht zu erkennen, ob dabei pG53BD der Form 14 oder 23 beteiligt war. Mit dem Auf-

treten dieses Kointegrate-Typs im Minilysat war die Stärke der 4350bp-EcoRI-Bande korreliert. Dieses Fragment ist nur in dem Kointegrat mit pG53BD der Form 23 enthalten (Abb.23 D). Es wird deshalb angenommen, daß in den Transformanten mit starker 4350bp-Bande eine Rekombination zwischen pG53BD(23) und pK21(14) über die IR1-Elemente stattgefunden hat und das resultierende Kointegrationsplasmid in den Zellen in relativ hoher Konzentration vorkommt (Abb.22b,c). In diesen Proben wird eine Beziehung zwischen den Intensitäten der 4350bp-Bande und der 4073bp-Bande von pK21(14) festgestellt. Je stärker die 4350bp-Bande ist, umso schwächer ist die andere. Die Entstehung des beschriebenen Kointegrats geht also zu Lasten von freiem pK21 und anderen Kointegraten (6 von 8 möglichen), die ebenfalls das 4073bp-Fragment enthalten.

Ähnliche Aussagen über abgelaufene Rekombinationsereignisse lassen sich bei den Supertransformanten, die keine starke 4350bp-Bande enthalten, nicht machen. Es ist jedoch interessant, daß in diesem Spezialfall nachgewiesen werden konnte, daß deutliche Mengenunterschiede der Rekombinationsprodukte auftreten können, die sich nur im Typ der Ausgangsplasmide und den IR-Elementen unterscheiden, über die die Integration stattgefunden hat. Dieses Ergebnis weist deutlich auf eine unterschiedliche Rekombinationshäufigkeit der verschiedenen möglichen Kombinationen von IR-Elementen hin. Dabei bleibt offen, ob dies auf vermehrte Bildung des beobachteten Kointegrats oder auf einen wesentlich langsameren Desintegrationsprozeß zurückzuführen ist. Ebenso ist die Ursache für das gelegentliche Auftreten dieser Vorgänge unklar.

Eine ähnliche Supertransformation wie bisher beschrieben wurde auch mit pK21 und dem Stamm JA221-pG53XY gemacht. Das Bandenmuster nach EcoRI-Spaltung kam von pK21(14) und pG53XY (Abb.22 t-v). Nur in einem von 16 untersuchten Klonen trat eine sehr schwache Bande auf, die von pK21(23) herrühren könnte. Weitere Hinweise auf invertiertes pK21 gab es nicht. In etwa einem Drittel der Transformanten konnte wieder die 4350bp-Bande beobachtet werden, die auch hier mit dem Auftreten des entsprechenden Kointegrationsplasmids korreliert war (Abb.22 v und w). Ein intermolekulares Rekombinationsprodukt vom Typ pG53XY-K21 ist prinzipiell nicht sichtbar, da seine Banden verdeckt werden. Unter Rücktransformanten dieser DNA befanden sich besonders viele mit dem Phänotpy Cam^R, Kan^R und Leu^- (Tab.4). Sie enthielten alle das Rekombinantplasmid pG53XY-K21 (Abb.22q). Die BamHI-Spaltung ergab, daß es sich ganz analog zu den anderen invertierenden Plasmiden um ein Gemisch der beiden Formen handelte, die hier x und y genannt werden. Es sieht so aus, als ob die Rekombinationsaktivität in diesen Klonen mit pG53XY höher gewesen sei als in denen mit pG53BD, da unter den Rücktransformanten solche mit intermolekularem Rekombinantplasmid fast doppelt so häufig sind wie bei pG53BD (Tab.4). Auch die Proben mit 4350bp-Fragment sind wesentlich häufiger. Ob sich dies auf die Nachbarschaft des Leserahmens A zu beiden IR-Elementen oder auf das Fehlen des Leserahmens C zurückführen läßt, ist unbekannt.

Die Supertransformation des Stammes JA221-pG53A (Flp^-) mit pK21 ergab keinen Hinweis auf Rekombination. Es ist daher sicher, daß auch für die intermolekulare Rekombination in E.coli ein aktives FLP-Gen benötigt wird.

Das wesentliche Ergebnis dieser Supertransformations-Experimente war, daß pK21(14) nicht erkennbar an Rekombinationen zu seiner Inversion teilnimmt, während es recht häufig mit pG53BD in einer FLP-abhängigen intermolekularen Reaktion rekombiniert. Das bedeutet, daß Rekombinationen, an denen zwei IR-Elemente von pK21 beteiligt sind, sehr langsam oder überhaupt nicht ablaufen im Gegensatz zu denjenigen über ein IR von pK21 und eines von pG53BD. Dies führte zu der Annahme, daß es rekombinationsaktive und -inaktive IR-Elemente gibt. Auf pK21 lägen dann nur inaktive IRs vor, in pG53BD ist dagegen mindestens eines aktiv. Für eine FLP-abhängige, intermolekulare Rekombination wird ein aktives IR-Element benötigt, das mit einem weiteren, aktiven oder inaktiven, IR auf einem anderen Molekül reagiert. Über die molekulare Ursache dieser Unterschiede in der Rekombinationsaktivität der IR-Elemente können nur Vermutungen angestellt werden. Da sich in pK21 und pG53BD die DNA-Sequenzen in den IR-Elementen und den umgebenden Bereichen nicht unterscheiden dürften, bleiben zur Erklärung nur Einflüsse aus der Nachbarschaft der IR-Elemente, welche unter anderem die Konformation der DNA an der Rekombinationsstelle verändern könnten. Da die Rekombination über eine Stelle in der ori-Region abläuft, in der zwei alternative Sekundärstrukturen möglich sind (Hartley & Donelson, 1980), kommen dafür weitreichende topologische Effekte oder Funktionen in der Nähe der IRs in Frage. Letzteres könnte zum Beispiel die Transkription des Tet-FLP-Gens sein, die die Konformation der Sekundärstruktur ändert und sie dadurch rekombinationsbereit macht. Dabei bleibt offen, ob die FLP-Aktivität selbst nur in cis wirkt, oder ein diffusibles Genprodukt von FLP in trans wirkt, aber nur auf die IR-Elemente einwirken kann, die durch ein exprimiertes FLP-Gen in cis aktiviert sind.

4.6.2 Inversion von pK21

Auf verschiedenen Wegen sollte auch dann pK21(23) entstehen können, wenn pK21(14) nicht direkt invertieren kann. Dies ist einmal möglich durch Inversion des pK21-Teils eines Kointegrationsplasmids und anschließenden Zerfall in pG53BD und pK21(23). Außerdem entsteht bei der Rekombination zwischen pG53BD-K21 und pK21 wieder pK21, das invertiert sein kann je nach Typ des beteiligten pG53BD-K21 und der rekombinierenden IR-Elemente. Um festzustellen, ob auch diese Rekombinationen mit geringer Frequenz in vivo ablaufen können, wurde weiter nach invertiertem pK21(23) gesucht.

Die ersten deutlichen Hinweise auf pK21(23) wurden in Minilysaten in Gegenwart von pG53XY gefunden, wenn die Supertransformanten wesentlich mehr Generationen nach der Transformation gewachsen waren. Im Gegensatz zum Ergebnis 30 Generationen nach der Transformation (Abb.22) konnte nach etwa 45 Generationen in allen Proben eine sehr schwache Bande bei 7580 bp festgestellt werden (Abb.24 a-c). Weitere 10 Generationen später war sie noch etwas stärker (Abb.24 d). Parallel dazu nahm auch die Kopienzahl von pG53XY-K21 zu, doch änderte sich danach bis 90 Generationen nach der Transformation, dem Ende des Beobachtungszeitraumes, die Plasmidzusammensetzung nicht mehr erkennbar. Da pG53XY-K21 nur in Umkehrung seiner Bildungsreaktion wieder zerfallen kann (Abb.23B), dafür aber den Zellen freie 2µmLEU2-DNA in ausreichender Konzentration fehlt, würde man eine stete Zunahme von pG53XY-K21 erwarten. Daß diese nicht beobachtet wird, kann vielleicht durch langsamere Replikation des 16kb großen Plasmids erklärt werden.

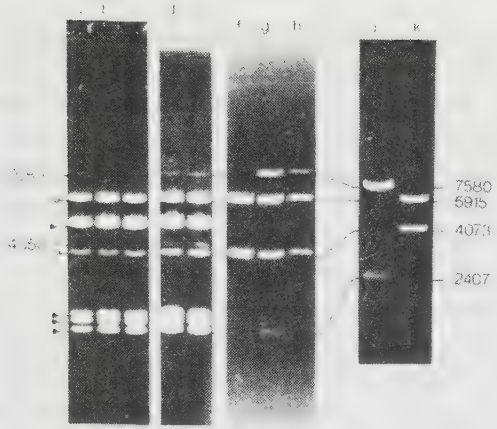


Abb.24: Nachweis von invertiertem pK21(23) in Supertransformanten.
EcoRI-gespaltene DNA aus E.coli-Minilysaten, elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt.
a-c: DNA aus Supertransformanten JA221-pG53XY mit pK21(14) ca. 45 Generationen nach der Transformation; d: wie a-c, aber ca. 55 Generationen nach Transformation; e: DNA aus Supertransformant JA221-pK21(14) mit pG53XY, ca. 55 Generationen nach Transformation; Markierung der Banden von pG53XY bzw. pK21(14) wie in Abb.22; Die Längen der typischen Banden von pK21(23) und des Kointegrationsplasmids sind unterstrichen;f-h: DNA aus jeweils 3 Rücktransformanten von pK21; f: Typ 14; g,h: Gemisch beider Typen; i: pK21(23); k: pK21(14).

In diesem Experiment war zum ersten Mal die gesuchte 7580bp-Bande von pK21(23) aufgetreten. Da in allen Proben parallel zu dieser Bande auch die 4350bp-Bande sichtbar wurde, liegen in diesen Zellen auch nachweisbare Mengen des Kointegrationsplasmids (Abb.23D) vor. Auch die 7580bp-Bande könnte von einem Kointegrat anderer Form herrühren. Diese Möglichkeit läßt sich nur ausschließen nach Rücktransformation des Plasmidgemischs, in dem die 7580bp-Bande aufgetreten war. Deshalb wurden Rücktransformanten des Phänotyps Kan^R und Cam^S, Leu^-, die nur pK21 enthalten, in Minilysaten auf den Typ ihres Plasmids hin untersucht. Damit die seltenen Kolonien mit pK21(23) gefunden und eine Aussage über ihre Häufigkeit gemacht werden konnte, mußte

eine größere Zahl von Kolonien getestet werden. Dazu wurden sie getrennt angezogen, in Gruppen zu je drei vereinigt und dann DNA daraus isoliert. In diesen Minilysaten konnte pK21(23) zum ersten Mal eindeutig nachgewiesen werden (Abb.24 g,h). Aus 84 untersuchten Transformanten ergibt sich ein Anteil dieses Typs an allen pK21-Kolonien von etwa 12%. Dieser Anteil an invertiertem pK21 wurde jeweils bei einem Klon aus der Supertransformation des pG53BD- und XY-Stammes gefunden.

Aus den Zahlen der Rücktransformation, die in Tabelle 4 zusammengefaßt sind, und diesem Ergebnis über den Anteil von pK21(23) lassen sich die relativen Kopienzahlen der verschiedenen Plasmide im untersuchten Klon berechnen (Tab.5). Dabei muß die Annahme gemacht werden, daß die Kolonien mit dem Phänotyp Cam^R, Kan^R, Leu^- überwiegend durch Transformation mit Kointegraten entstanden sind und nicht durch Cotransformationen. Trotz dieser Einschränkung und der statistischen Unsicherheit aufgrund der geringen Probenzahl ist aus Tabelle 5 ersichtlich, daß die intermolekularen Rekombinationsprodukte von pK21 (pG53BD-K21 und Kointegrate) zusammengenommen etwa 7mal

Plasmid	Häufigkeit in den Supertransformanten JA221-pG53BD + pK21		JA221-pG53XY + pK21	
pG53 (14+23)	39%		27%	
pG53-K21 (14+23)	16%		37%	
Kointegrate	12%		10%	
pK21: Typ 14	28%	32%	23%	26%
Typ 23	3,8%		3%	

Tab.5: Häufigkeit der Plasmide in den Supertransformanten (berechnet aus den Daten von Tab.4).

(beim BD-Stamm) bis 12mal (XY-Stamm) so häufig sind, wie invertiertes pK21(23). Da die effiziente intermolekulare Rekombination zwischen pG53-Plasmiden und pK21 bewiesen ist, sollte sie auch zwischen pG53BD-K21 und pK21(14) ablaufen und zum Teil pK21(23) liefern. Die Häufigkeit dieser Rekombination hängt von den Kopienzahlen der beiden Plasmide ab. Sie reicht im vorliegenden Fall sicher aus, um die geringe Menge pK21(23) als Produkt dieser Reaktion zu erklären. Dadurch ist eine direkte Inversion von pK21(14) sehr unwahrscheinlich geworden, wenn auch eine sehr langsame Reaktion nicht ausgeschlossen werden kann.

In einem anderen Experiment wurde festgestellt, daß die geringe Inversion von pK21 nicht durch das Testverfahren vorgetäuscht wird, in dem durch die Supertransformation einzelne pK21-Moleküle in Zellen mit einer hohen Kopienzahl von pG53-Plasmiden gebracht werden. Bringt man nämlich die beiden Plasmide durch Supertransformation des pK21-Stammes mit pG53XY im umgekehrten Verhältnis zusammen, so unterscheiden sich die Bandenmuster in den Minilysaten nicht von den bisher besprochenen (Abb.24 e). Insbesondere trat pK21(23) in allen Fällen gleich selten auf. Einige weitere Gründe für das seltene Auftreten von pK21(23) konnten ausgeschlossen werden. So ist pK21(23) in ähnlicher Kopienzahl in den Rücktransformanten enthalten wie die Form 14 (Abb.24 i), es wird stabil repliziert und vermittelt Kanamycin-Resistenz. Auch die Supertransformation eines pG53BD-Stammes mit pK21(23) ergibt nach 30 Generationen pG53-K21-Plasmide, aber kein invertiertes pK21 der Form 14. Damit ist gezeigt, daß auch die Form 23 von pK21 nicht schneller invertiert.

Diese Ergebnisse kann man so zusammenfassen, daß pK21 in Gegenwart von pG53-Plasmiden nicht effizient invertiert wird. Die geringe Inversionsrate läßt sich durch Sekundärreaktionen des Typs
pG53BD-K21(14/23) + pK21(14) ⟶ pG53BD-K21(14/23) + pK21(14/23
erklären. Es wird angenommen, daß diese Eigenschaft von pK21 darauf zurückzuführen ist, daß es nicht-aktivierte IR-Elemente enthält.

4.7 Inversion anderer flp-Plasmide in E.coli-Stämmen mit FLP-Aktivität

In 4.6 ist postuliert worden, daß sich die IR-Elemente der Derivate von 2µm-DNA in ihrer Fähigkeit zur Rekombination unterscheiden. Deshalb werden in den folgenden Experimenten andere Plasmide auf ihr Rekombinationsverhalten in Gegenwart von pG53-Plasmiden getestet. Leider können dabei nicht beliebige Kombinationen von Plasmiden untersucht werden, da beide Plasmide sich in einem Selektionsmarker und dem Bandenmuster eindeutig unterscheiden müssen. Das Plasmid pJDB219(14) (Abb.26 A) eignet sich wegen seiner Tetracyclin-Resistenz gut für die Supertransformation von JA221-pG53BD. Es unterscheidet sich von pK21 vor allem dadurch, daß sein L-Segment identisch ist mit dem von pG53BD und der bakterielle Vektor im S-Segment integriert ist. Deshalb entstehen beim Segmentaustausch zwischen pJDB219 und pG53BD durch intermolekulare Rekombination wieder die Ausgangsplasmide, die dabei invertiert werden können.

Die Minilysate von Supertransformanten mit pG53BD und pJDB219(14) ergaben ein Bandenmuster, das nur von den Ausgangsplasmiden herrührte (Abb.25). Nur in einzelnen Fällen ist eine sehr schwache 4350bp-Bande zu erkennen, die auf wenig invertiertes pJDB219 vom Typ 23 hindeutet. Das Verhalten von pJDB219 in Gegenwart von pG53BD ent-

spricht also dem von pK21, jedoch können hier keine Aussagen über intermolekulare Rekombinationen gemacht werden, da sich beide Plasmide nur in einem Segment unterscheiden. Auffallend war, daß in den Transformanten das Verhältnis von Typ 14 und 23 von pG53BD nicht mehr ausgeglichen war, sondern meist eine Form deutlich überwog. Dies ist in Abb.25 a-c an den 7540- und 7820bp-Banden zu sehen. Dabei wurden unter 12 Supertransformanten 7 mit Typ 14, 4 mit Typ 23 und 1 mit beiden Formen von pG53BD gefunden. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, daß in diesen Transformanten die Segregation der miteinander inkompatiblen Formen von pG53BD schneller abläuft, als das FLP-abhängige Rekombinationssystem die verlorengegangene Form durch Inversion nachliefern kann.

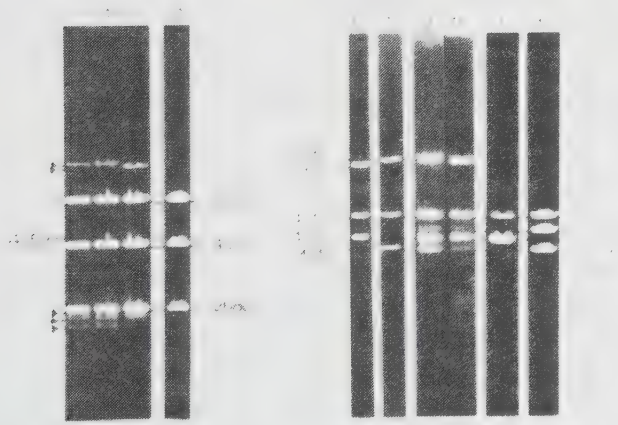


Abb.25: Inversion von flp-Plasmiden in Gegenwart von pG53-Plasmiden.
Minilysat-DNA wie in Abb.24, mit EcoRI gespalten; a-c: Supertransformanten von JA221-pG53BD mit pJDB219(14); d: pJDB219(14); links sind die Banden von pG53BD markiert; (4350): gesuchte Bande von pJDB219(23), rechts sind die Längen der Fragmente von pJDB219(14) angegeben; e: pCTE(14); f: pCTE(23); g,h: Supertransformanten JA221-pG53XY mit pCTE(23); i: pCTE-LEU2(14); k: pCTE-LEU2(23); links sind die Längen der pCTE-Fragmente angegeben, die von Typ 23 sind unterstrichen; rechts Fragmente von pCTE-LEU2.

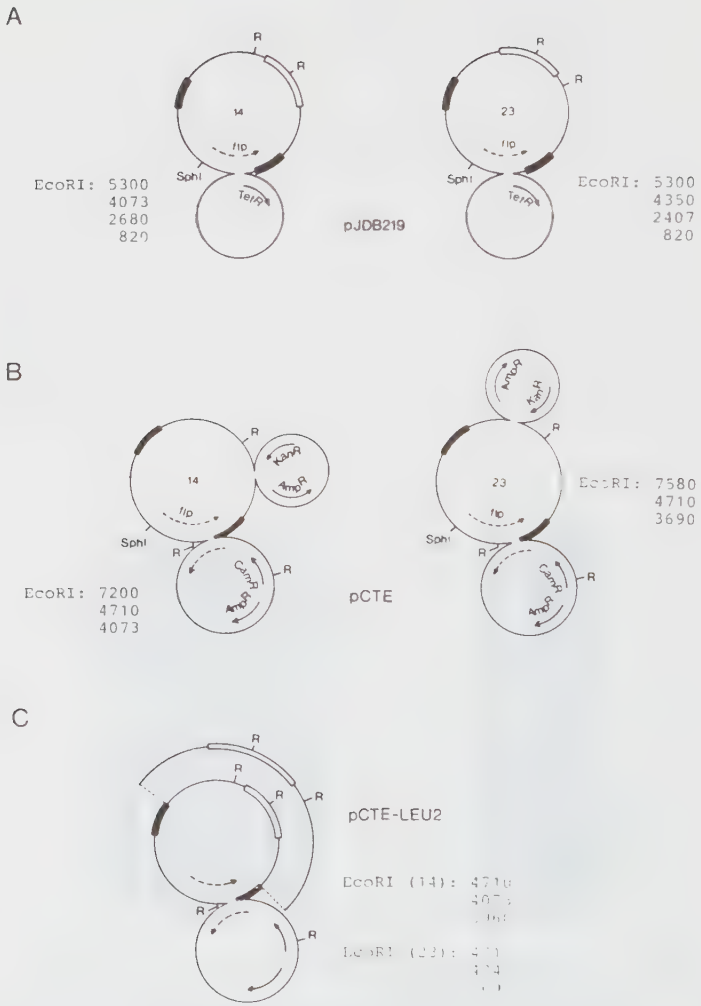


Abb.26: Schemata von flp-Plasmiden.
A: pJDB219(14) (Beggs, 1978) und (23);
B: pCTE(14) und (23);
C: in vivo entstandenes pCTE-LEU2(14) (innen) und (23) (äußeres Kreissegment); Darstellungen wie in Abb.23.

Um die Vermutung von 4.6 testen zu können, daß ein IR-Element durch die Transkription des benachbarten FLP-Gens aktiviert wird, wurde das flp-Plasmid pCTE konstruiert (Abb.26 B). Dazu wurde pK21, das aus einem E.coli-Stamm mit dam^--Phänotyp (Dreiseikelmann et al., 1979) isoliert wurde, mit BclI im Leserahmen A der 2µm-DNA geschnitten. Es wurde mit BamHI-gespaltenem pBR325 ligiert über die gemeinsame innere Basensequenz der beiden Schnittstellen. Durch die Insertion von pBR325 in den Leserahmen A enthält pCTE ein defektes FLP-Gen. Die vom Tet^R-Promotor ausgehende Transkription kann jedoch noch das 3'-Ende des Leserahmens A transkribieren und könnte dadurch das IR2 rekombinationsaktiv machen. Die Transformanten mit pCTE lassen sich auf den Phänotyp Cam^R, Kan^R selektieren.

Zum Test der Inversion von pCTE(14) wurde JA221-pCTE mit pG53XY transformiert. Die Selektion der Supertransformanten war nur auf die Marker Leu^+ und Kan^R möglich. Deshalb war die Ausbeute an Plasmid-DNA in den Minilysaten gering und die Auswertung der Gele ist etwas erschwert (Abb.25 g,h). Das Bandenmuster in diesen Proben läßt sich so deuten: In den Transformanten ist relativ viel pCTE(14) und etwa gleich viel invertiertes pCTE(23) enthalten. pG53XY ist nicht zu finden, auch das eine Produkt der intermolekularen Rekombination pG53XY-K21 mit dem L-Segment aus pCTE und dem S-Segment aus pG53XY läßt sich kaum nachweisen. Dagegen enthalten alle Proben beide Formen des anderen Rekombinationsprodukts pCTE-LEU2 (Abb.26 C), wie durch Rücktransformation gezeigt werden konnte (Abb.25 i,k). Der Verlust von pG53XY und pG53XY-CTE ist wohl darauf zurückzuführen, daß nicht auf Cam^R selektiert wurde und der Leu^+-Phänotyp von pCTE-LEU2 stammt.

Mit dem Nachweis einer effizienten Inversion von pCTE ist gezeigt, daß auch ein Plasmid mit defektem FLP-Gen invertieren kann, wenn das Ende des Leserahmens A in das IR2-Element hinein transkribiert werden kann und ein anderes Plasmid mit dem Tet-FLP-Gen die FLP-Aktivität liefert. Da in diesen Supertransformanten auch rege intermolekulare Rekombination stattgefunden hat, kann daraus noch nicht mit Sicherheit auf eine Wirkung von FLP in trans geschlossen werden. Ein Vergleich der Mengen an invertierten flp-Plasmiden in den beiden Experimenten mit pJDB219(14) und pCTE(14) in Gegenwart von pG53-Plasmiden unterstützt die Vermutung, daß eine Transkription, die aus dem S-Segment kommend in das IR2 hineinläuft, für die direkte Inversion eines Plasmids notwendig ist. Es kann jedoch bei diesen Versuchen nicht ausgeschlossen werden, daß auch andere Unterschiede in der Struktur beider Plasmide eine Rolle für ihr Inversionsverhalten spielen.

4.8 Nachweis der trans-Aktivität des FLP-Gens

Alle bisher besprochenen FLP-abhängigen Rekombinationsprodukte lassen sich auch durch die Annahme erklären, sie seien über intermolekulare Rekombinationen entstanden, bei denen das FLP-Gen nur in cis beteiligt war. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde ein Plasmid pGTT1 konstruiert, das selbst an keiner intermolekularen Rekombination teilnehmen kann, aber ein intaktes Tet-FLP-Gen trägt. Wenn ein flp-Plasmid in Gegenwart dieses Plasmids invertiert wird, kann das FLP-Gen nur in trans gewirkt haben. Da pGTT1 selbst nicht rekombinieren darf, entfernt man die Sequenzen, über die die Rekombination abläuft. Von Broach et al. (1982) wurde dieser Bereich in den IR-Elementen auf 65bp eingegrenzt, die im Bereich der XbaI-Schnittstellen liegen. Durch Spaltung von pG53BD mit XbaI wurde das gesamte L-Segment mit den angrenzenden Stücken der beiden IR-Elemente deletiert und dabei die Rekombinationsstellen entfernt. Da die Religation der

beiden IR-Fragmente durch direkt aufeinanderfolgende invertierte Duplikationen zu einer instabilen Struktur führen könnte (Collins, 1981), wurde pACYC177 insertiert. Dazu mußten die XbaI-Enden von pG53BD und die BamHI-Enden von pACYC177 mit SalI-Linkern versehen und ligiert werden. pGTT1 (Abb.27 A) trägt deshalb die Cam- und Kan-Resistenz und kann nur mit pJDB219 und BTYP-1 getestet werden.

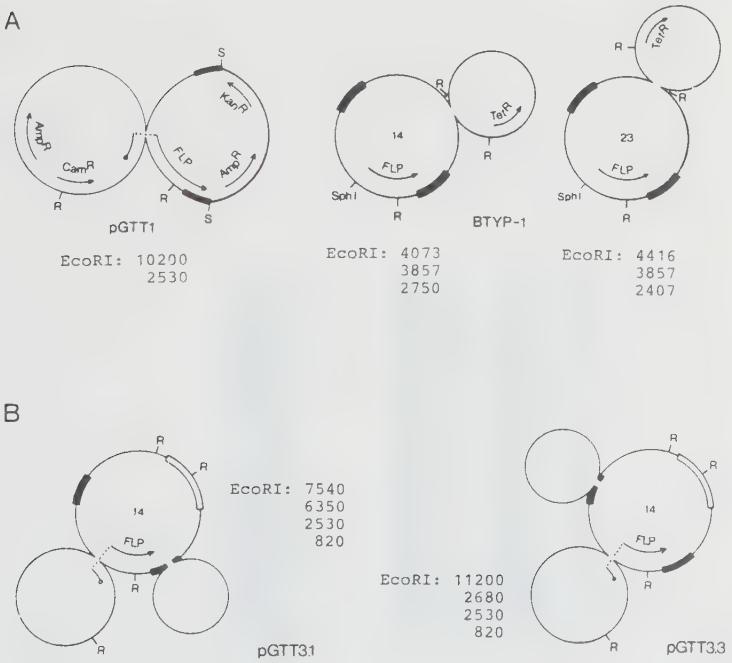


Abb.27: Schemata der Plasmide für die Untersuchung der trans-Aktivität des FLP-Gens.
A: links: pGTT1 mit Tet-FLP-Gen und pACYC177 (dicke Linie) zwischen SalI-Schnittstellen (S) in die IR-Elemente von 2µm-DNA eingesetzt; rechts: BTYP-1 Typ 14 (Hollenberg, 1978) und 23.
B: pGTT3.1 und 3.3 als Beispiele für sicher nicht invertierende FLP-Plasmide; Erläuterungen im Text S.101; Darstellungen wie in Abb.23.

Die Supertransformationen von JA221-pGTT1 mit BTYP-1(14) beziehungsweise pJDB219(14) erfolgten mit erstaunlichen Unterschieden in der Transformationsfrequenz und der Viabilität der Transformanten. Es wurden keine absoluten Zahlen bestimmt, aber die Frequenz mit pJDB219 lag etwa 50mal so hoch wie mit BTYP-1. Außerdem wuchsen die Klone mit pJDB219 erheblich schneller als die anderen. Dafür konnte keine Erklärung gefunden werden. Nach EcoRI-Spaltung der Minilysat-DNA dieser Klone 30 Generationen nach der Transformation waren pGTT1 und BTYP(14) bzw. pJDB219(14) im Bandenmuster klar zu erkennen (Abb.28). Daneben enthielten alle Proben in geringerer Menge jeweils eine Bande von 4350 bzw. 4416bp, die sich nur als Fragmente von invertiertem BTYP-1(23) bzw. pJDB219(23) erklären lassen. Obwohl sich die Intensität der Banden von Minilysat

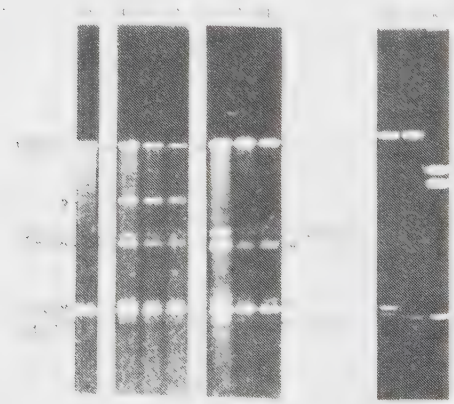


Abb.28: Nachweis der trans-Aktivität des FLP-Gens. Minilysat-DNA wie in Abb.24, mit EcoRI gespalten; a: pGTT1; b-d: Supertransformanten JA221-pGTT1 mit pJDB219(14); e-g: Supertransformanten JA221-pGTT1 mit BTYP-1(14); angegeben sind die Längen der Fragmente von pGTT1 (links) und unterstrichen die der gesuchten pJDB219(23) (links) und BTYP-1(23) (rechts); die Fragmente der Ausgangsplasmide pJDB219(14) bzw. BTYP-1(14) sind durch Striche mit Kreis markiert; h: pGTT3.3; i: pGTT3.2; k: pGTT3.1.

im Gel nicht quantitativ auswerten und vergleichen läßt, kann man ungefähr sagen, daß die Inversion in allen 12 getesteten Klonen beider Supertransformationen langsamer abgelaufen ist als die Inversion von pCTE (Abb.25 g,h) oder die intermolekulare Rekombination zwischen pG53BD und pK21(14) (Abb.22 b-h), jedoch deutlich schneller als die Inversion von pK21(14) (Abb.24 a-c) oder pJDB219 (Abb.25 a-c).

Durch die Inversion dieser beiden Plasmide in Gegenwart eines nicht rekombinierenden Plasmids mit Tet-FLP-Gen ist zweifelsfrei geklärt, daß die FLP-Aktivität des Tet-FLP-Gens in trans wirkt. Alle früheren Ergebnisse hatten die Hypothese gestützt, daß für eine effiziente Rekombination ein beteiligtes IR-Element durch eine Aktivität in seiner Nachbarschaft rekombinationsbereit gemacht werden muß. Die Beobachtung einer langsamen Inversion von pJDB219(14) und BTYP-1(14) in Abwesenheit aktivierter IR-Elemente widerspricht dem nicht unbedingt. Es wird unter diesen Bedingungen nur ein Reaktionsweg eingeschlagen, der in Gegenwart aktivierter IR-Elemente keine Bedeutung hat.

Bei der Konstruktion von pGTT1 waren auch Transformanten erhalten worden, deren Plasmide pGTT3 durch unvollständige XbaI-Spaltung von pG53BD das L-Segment noch enthielten und pACYC177 nur in ein IR-Element insertiert war (Abb.27B). Unabhängig davon, in welches IR insertiert worden war und welche Form vorlag, invertierten die Insertionsplasmide pGTT3.1, 3.2 und 3.3 nicht (Abb.28 h-k). Dies bestätigt die Kartierung der Rekombinationsstelle von Broach und legt nahe, daß das FLP-System auch in der heterologen Umgebung von E.coli genau diese Stelle benutzt. Es handelt sich also auch bei dem in E.coli beobachteten Vorgang um eine "site"-spezifische Rekombination wie in Hefe. Dies bestätigt auch, daß eine Beteili-

gung von pGTT1 an intermolekularer Rekombination in den Supertransformationsexperimenten ausgeschlossen ist. Außerdem stimmt dies gut mit der Beobachtung überein, daß die FLP-abhängige Rekombination nicht über andere Duplikationen in den pG53-Plasmiden stattfinden kann. Die beiden Amp^R-Gene und die Regionen des Replikationsstarts von pBR325 und pACYC177 stellen in pG53BD-K21 solche Duplikationen dar, die je nach Form des Plasmids direkt oder invertiert vorliegen.

5. Diskussion

5.1 Transkription endogener 2µm-DNA im Hefestamm H1

Durch "Northern"-Experimente wurden 11 Transkripte der endogenen 2µm-DNA in poly(A)-haltiger RNA des Hefestamms H1 nachgewiesen (Tab.1). Diese Transkripte liegen in der Zelle in äußerst geringen Mengen vor. Deshalb konnten die Transkriptionsbereiche nur für die häufigsten 2µm-Transkripte durch "Northern"-Hybridisierung mit definierten kleinen DNA-Fragmenten und durch Abbau mit S1-Nuklease kartiert und ihre Richtung durch Einzelstrang-Hybridisierung festgestellt werden (Abb.8). Nur etwa 15% der Sequenz von 2µm-DNA in der Nähe des Replikationsursprungs ori treten nicht in den Transkripten auf. Da in den meisten Bereichen beide DNA-Stränge als Matrize verwendet werden, und jeweils auch in der gleichen Richtung überlappende RNAs auftreten, wird eine Gesamtlänge der Transkripte von etwa 17kb möglich, was dem 2,7fachen der Länge von 2µm-DNA entspricht. Dies bestätigt im wesentlichen die Ergebnisse von Broach et al. (1979).

Die Untersuchung der Transkripte von 2µm-DNA wurde sehr erschwert durch die geringen Mengen, die von diesen RNAs in den Hefezellen vorliegen. Für eine der Hauptbanden wurde ein Anteil von etwa 0,001% der poly(A)-RNA bestimmt. Ein Vergleich mit Daten für andere mRNAs zeigt, daß es sich hier um eine besonders seltene Klasse von RNA handelt. So wird z.B. die RNA der etwa 30 Ty1-Elemente im Hefegenom auf 5 bis 10% (Elder et al., 1981), die mRNA von ADH2 auf 1% (Denis et al., 1981) und von CYC1 auf 0,1% (Zitomer & Hall, 1976) der poly(A)-RNA von Hefe geschätzt. Der Wert von 0,01% für die mRNA des nicht-induzierten URA3-Gens (Bach et al., 1979) stellt die untere Grenze der bis jetzt untersuchten Hefe-Gene dar. Vom URA3-Gen, einem Beispiel aus der Gruppe der "housekeeping"-Gene,

liegen im nicht-induzierten Zustand etwa 10mal mehr Transkripte in der Zelle vor als von den 50 bis 100 Kopien der 2µm-DNA. Daher müssen äußerst geringe Mengen der Genprodukte von 2µm-DNA ausreichen, um ihre Aufgaben, wie die Aufrechterhaltung der Kopienzahl und die Inversion der 2µm-DNA (Broach & Hicks, 1980), erfüllen zu können. Vergleichbare Halbwertszeiten vorausgesetzt, bedeutet dies, daß die Transkription der 2µm-DNA etwa drei Größenordnungen schwächer ist als die eines schwach exprimierten Hefe-Gens.

Wenn man die RNA-Menge in Molekülen pro Zelle ausdrückt, kommt man für die Transkripte der drei Gene von 2µm-DNA jeweils auf etwa 0,5 bis 3 Kopien pro Zelle, für die selteneren RNAs sicher weit unter 0,1 Kopie. In einer groben Abschätzung ergibt sich daraus zum Beispiel, daß bei einer angenommenen Halbwertszeit der RNA von 10 min nur etwa von jedem zehnten Molekül 2µm-DNA ein Transkript pro Zellzyklus abgelesen werden kann, oder bei Transkription aller Moleküle einmal pro Zellzyklus die mRNAs Halbwertszeiten von höchstens etwa 0,5 min haben können. Da die durchschnittliche Halbwertszeit von Hefe-mRNA bei etwa 10-20 min liegt (Chia & McLaughlin, 1979; Koch & Friesen, 1979), ergibt sich entweder eine ganz speziell hohe Abbaurate der plasmid-codierten mRNAs oder eine besonders geringe Transkriptionsrate. Dies könnte zum Beispiel durch einen oder mehrere, äußerst schwache Promotoren bewirkt werden, die eventuell auch nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus aktiv sind, so daß pro Generation rein statistisch nur einige wenige Plasmide transkribiert werden. Oder in einem anderen Modell könnte die Transkription auf einzelne, aktive Moleküle beschränkt sein. Es wird später (s. 5.3) ein Befund diskutiert werden, der dieses letzte, etwas ausgefallene Modell wahrscheinlicher werden läßt (s. auch 5.4).

Die Transkripte der drei Gene FLP, REP1 und REP2 (beziehungsweise Leserahmen A, B und C) sind neben einer 1280b-RNA die häufigsten Transkripte der 2µm-DNA. Da diese vier RNAs zwischen 1190 und 1420b lang sind, konnten ihre Banden im Autoradiogramm nicht aufgelöst werden. Erst durch aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit unterschiedlichen kleinen DNA-Fragmenten wurden diese RNAs voneinander unterschieden und exakt kartiert. Aufgrund dieser Verbesserung der Methodik konnten in der vorliegenden Arbeit die Angaben von Broach et al. (1979) für diese RNAs korrigiert werden.

Die 1320b- und 1190b-Transkripte decken sich mit den REP1- und REP2-Genen. Ihre genaue Eingrenzung durch S1-Kartierung auf ± 30bp zeigt, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die mRNAs dieser Gene handelt. Alle bisherigen Untersuchungen haben zu der Feststellung geführt, daß in Hefe immer das erste AUG-Codon auf der mRNA als Translationsstart verwendet wird (Sherman & Stewart, 1975; Sherman et al., 1980; Stiles et al., 1981; Breunig et al., 1982 und B. Hall. pers. Mitt.). Dies scheint eine allgemeine Regel für die Translation eukaryontischer Gene zu sein (Kozak, 1980). Ausnahmen findet man nur bei einigen Viren. Vorausgesetzt, diese Regel gilt auch für die Gene der 2µm-DNA, so ergibt sich aus der DNA-Sequenz, daß die mRNAs höchstens 18b bei REP1 oder 52b bei REP2 vor dem ATG-Startcodon beginnen dürfen, da sonst ein anderes AUG zu einem falschen Translationsstart führen würde. Da die 1320b- und 1190b-RNAs jeweils knapp vor den Leserahmen beginnen, entsprechen sie genau den Erwartungen für die mRNAs der Gene REP1 und REP2. Die Lage der 1320b- und 1190b-Transkripte entspricht der, die für 1375b- und 1275b-RNAs im Bereich der Leserahmen B und C angegeben wurden (Broach et al., 1979). Obwohl der Längenunterschied zwischen 1190 und 1275b nur ca. 7% beträgt, scheint mir wegen der sonst sehr guten Übereinstimmung der Längenmessungen in beiden Arbeiten

bei Broach (op. cit.) eine Verwechslung der 1190b-RNA vom Leserahmen C mit der 1280b-RNA bei Leserahmen A (s. weiter unten) vorzuliegen.

Die 1420b-RNA konnte im Bereich des Leserahmens A nicht mit der gleichen Präzision kartiert werden. Sie kann aber aufgrund ihrer Lage, Länge und Transkriptionsrichtung mit hoher Wahrscheinlichkeit als mRNA des FLP-Gens angesehen werden. Dies entspricht auch den Daten von Broach (op. cit.).

Die etwa 700b lange RNA im Bereich des Leserahmens D ist wahrscheinlich die mRNA dieser bis jetzt funktionell nicht charakterisierten Sequenz. Broach gibt allerdings für eine 700b-RNA in diesem Bereich die umgekehrte Orientierung an. Möglicherweise ist der Leserahmen D ein weiteres Gen der 2µm-DNA. Da in der Literatur bei Insertion in diesen Leserahmen keine Änderungen im Replikations- und Rekombinationsverhalten der 2µm-DNA beschrieben wurden, sollte dessen Genprodukt aus 184 Aminosäuren keine Bedeutung für diese Funktionen haben.

Eine relativ sehr häufige 1280b-RNA konnte nachgewiesen und eindeutig von der 1320b-RNA des REP1-Gens unterschieden werden. Diese RNA wird von Broach nicht angegeben, aber seine sehr breite "1420b"-Bande mit einer Hybridisierungsprobe aus diesem Bereich nach längerer Exposition (s. Fig. 3b in: Broach et al., 1979) kann so gedeutet werden, daß sie aus zwei nahe beieinanderliegenden Banden besteht. Es ist jedoch unklar, weshalb diese Doppelbande aus 1280b- und 1420b-RNAs dort im Gegensatz zu meinen Experimenten so schwach hybridisiert. Wenn die 1280b-RNA im kartierten Bereich kontinuierlich transkribiert wird, kann sie nicht für ein Protein codieren. Der Leserahmen E ist zwar in ihr enthalten, doch ist er mit 348bp viel zu klein und zu weit vom 5'-Ende entfernt, um als ihr trans-

latierter Teil angesehen zu werden. Selbst wenn man den modifizierten genetischen Code der Hefe-Mitochondrien (Bonitz et al., 1980) zugrunde legt, ist kein durchgehendes Leseraster vorhanden. Andere bekannte Phänomene der Translation, wie das Überlesen von Stopcodons (Übersicht bei Ryoji et al., 1983) oder Codon-Slippage (Weiss & Gallant, 1983), die in einzelnen Fällen zur Expression einer mRNA mit internen Stopcodons führen, können wegen der großen Zahl der Stopcodons in diesem Bereich keine Rolle spielen. Um der 1280b-RNA eine protein-codierende Funktion zuordnen zu können, müßte man für ihre Entstehung mehrmaliges Spleißen einer Vorläufer-RNA annehmen, wodurch mehrere kurze Stücke zu einem offenen Leseraster zusammengesetzt werden. Dafür gibt es jedoch keine Hinweise, zum Beispiel wurde in den "Northern"-Experimenten keine Hybridisierung der 1280b-RNA bemerkt, die außerhalb ihres eigentlichen Transkriptionsbereichs lag. Es wäre jedoch denkbar, daß innerhalb dieses Bereichs ein großes offenes Leseraster aus dem Leserahmen E und kleineren Bereichen zwischen den davorliegenden Stopcodons durch Herausschneiden mehrerer kleiner Intronsequenzen zusammengestückelt wird. Diese wenig wahrscheinliche Möglichkeit kann mit der "Northern"-Technik nicht untersucht werden.

Interessant ist eine Folgerung aus der Kartierung dieser Transkripte. Die bäumchenartigen Sekundärstrukturen in den IR-Elementen sind nicht nur wichtig für die Replikation und Rekombination der 2µm-DNA (Broach & Hicks, 1980), sondern haben anscheinend auch Bedeutung für das 3'-Ende von Transkripten. Die 1320b- und 1190b-RNAs enden beide aus unterschiedlichen Richtungen kommend innerhalb ± 15bp am Anfang dieser Region in IR1 (in Form 14). Das 1420b-Transkript von FLP muß in IR2 ebenfalls in diesem Bereich enden. Der Leserahmen C des REP2-Gens endet an der Grenze des IR-Elements 1 zum S-Segment, während der Leserahmen A des FLP-Gens etwa 180bp weit in das IR-Ele-

ment 2 hineinreicht. Die Transkriptionsbereiche beider Leserahmen enthalten also im 3'-Teil identische Sequenzen und es war die Frage, ob die Transkription beider Gene an unterschiedlichen Stellen enden kann. Dies ist nicht der Fall, sondern die 1190b- und 1420b-RNAs enden beide etwa an der gleichen Stelle am Beginn der bäumchenartigen Sekundärstruktur nach dem Ende des längeren Leserahmens A. Daher hat die 1190b-RNA von REP2 einen sehr langen 3'-nicht-codierenden Teil, der ein Viertel ihrer Gesamtlänge ausmacht. Die 120bp großen bäumchenartigen Sekundärstrukturen könnten als Terminationssignale für die RNA-Polymerase wirken,oder in größeren Primärtranskripten Signale für das Prozessieren sein.

Von Zaret und Sherman (1982) wird eine Sequenzähnlichkeit vieler Hefe-Gene im 3'-nichttranslatierten Bereich kurz vor dem Ende der mRNA festgestellt. Eine Deletion in diesem Bereich hat im Fall des CYC1-Gens eine falsche Termination der Transkription zur Folge. Die Consensus-Sequenz 5' ... TAG ... $\begin{matrix}\text{TAGT}\\\text{TATGT}\end{matrix}$ ... TTT ... 3' ist auch auf den 3'-Enden der Transkriptionsbereiche der Leserahmen A, B, C und D vorhanden (Tab.6). Obwohl diese Sequenzen in der AT-reichen 2µm-DNA relativ häufig sein dürften, kann das übereinstimmende Auftreten genau am Ende dieser vier Transkriptionsbereiche als eine Bestätigung für ihre Kartierung angesehen werden. Die Erkennungsstelle AAUAAA für Polyadenylierung in Eukaryonten (Proudfoot & Brownlee, 1976) ist nur auf der 700b-RNA verkürzt als AAUAA enthalten. Diese Sequenz scheint in Hefe nicht essentiell für die Polyadenylierung zu sein, da sie bei vielen Hefe-Genen fehlt (Zaret & Sherman, 1982).

Cons.:	Stop...1-140...TAG...2-14... $\frac{\text{TAGT}}{\text{TATGT}}$ ...11-17...TTT.../
FLP:	TAA ... 76 ... TAG ...22... TATGT ...13...N*.3.TTT ...
REP1:	TAG ... $(TAG)_2$..(zus. 82)... TAGT ... 21 ... TTT...15...N*
REP2:	TGA ... $(TAG)_6$..(zus. 280).. TATGT...13...N*.3.TTT ...
D:	TAG .2. TAG ... 19 ... TATGT .1. TTT ...100...N*...

Tab.6: Vergleich der 3'-Enden der Gene von 2µm-DNA mit der Consensus-Sequenz von Zaret und Sherman (1982). Der Bereich zwischen Stopcodon und TAG soll T-reich, der zwischen TAGT/TATGT und TTT (A+T)-reich sein, was aber bei den Genen der 2µm-DNA nicht sehr ausgeprägt ist. Da die Lage der poly(A)-Additionsstelle (Schrägstrich / in der Consensus-Sequenz) bei den Transkripten der 2µm-DNA nicht exakt bekannt ist, ist zum Vergleich jeweils das erste Nukleotid der Sekundärstruktur (für FLP und beide REP die 120bp-Regionen in den IR-Elementen; für D eine symmetriereiche Region im L-Segment) durch N* gekennzeichnet. Abstände der Sequenzteile sind in Basenpaaren angegeben.

Zusätzlich zu den bisher ausführlich besprochenen Haupttranskripten der 2µm-DNA wurden noch RNAs von 2770b, 2040, 1600b und 930b gefunden, die in allen Parametern den Angaben von Broach et al. (1979) entsprechen. Weiter wurden im S-Segment schwache Banden von RNAs mit 2430b und 1580b Länge nachgewiesen, die bisher nicht beschrieben worden sind. Dagegen konnten die 1075b- und 700b-RNAs im Leserahmen B nicht bestätigt werden. Die Zuordnung der 1075b-RNA zum Leserahmen B kann anhand der publizierten Autoradiogramme (Broach et al., 1979) nicht überprüft werden. Es liegt jedoch nahe, hier eine Verwechslung mit dem 1190b-Transkript des REP2-Gens (Leserahmen C) anzunehmen.

Alle diese RNAs sind wesentlich seltener als die Haupttranskripte und ließen sich deshalb nur viel weniger genau auf der 2µm-DNA lokalisieren. Da sie alle keine Transkripte von Leserahmen sind, gilt für sie im Prinzip das gleiche wie für die 1280b-RNA. Sie enthalten so viele Stopcodons in allen Rastern, daß sie sicher keine Proteine codieren

können. Trotzdem scheinen sie eng assoziiert mit den Polysomen aufzutreten (s. 3.5). Man könnte daraus eventuell auf eine regulatorische Funktion dieser RNAs bei der Translation schließen. Oder ihr Auftreten in der polysomalen RNA ist ein Artefakt der Polysomenpräparation. Dabei könnte die Zugabe von Cycloheximid zur Hefekultur 15 min vor dem Ernten der Zellen eine Rolle spielen. Cycloheximid stabilisiert Polysomen durch Hemmung der Peptidyl-Transferase-Aktivität an der 60S-Untereinheit der Ribosomen. Falls z.B. auch die nicht-translatierbaren RNAs ab und zu mit den Ribosomen-Untereinheiten und Initiationsfaktoren zusammentreten können und für kurze Zeit einen stabilen Komplex bilden -an dem eventuell auch kurze Peptide synthetisiert werden könnten- so werden derartige Komplexe durch Cycloheximid stabilisiert und möglicherweise alle diese RNAs darin "eingefangen".

Broach et al. (1979) haben ein Schema vorgeschlagen, nach dem die größeren RNAs Vorläufer-Transkripte sind, die in funktionelle mRNAs und eventuell funktionslose andere RNAs gespalten werden. Damit verknüpft wurde die Hypothese, daß die Transkription der 1420b-RNA (FLP-Gen) nur in Form 14 und der 1275b-RNA (≙1190b-RNA von REP2) nur in Form 23 möglich ist. Die Expression dieser Gene könnte dann durch Interkonversion der beiden Formen von 2µm-DNA reguliert werden. Ähnliche Modelle der alternativen Expression von Genen durch invertierbare Elemente sind für Antigene bei Trypanosomen (Zieg et al., 1977) und für die Adsorptionseigenschaften des Bakteriophagen Mu (Bukhari & Ambrosio, 1978) bewiesen worden. Die Hypothese der Regulation der drei Gene von 2µm-DNA durch Inversion konnte in den Experimenten mit pJDB219 und pL610/616 eindeutig widerlegt werden (s. 5.3). Eine Regulation der Expression von 2µm-DNA durch Inversion ist auch dadurch unwahrscheinlich geworden, daß andere Ergebnisse mit den Rekombinantplasmiden zu einem Modell führten, in dem dimere Plasmide so transkribiert

werden, daß die Sequenzen beider Einzelstränge in Primärtranskripten auftreten (s. 5.3). Somit ist auch die Regulation der 1280b- oder 930b-RNA durch Inversion nur mehr eine theoretische Möglichkeit, die nicht völlig ausgeschlossen werden kann (s. 3.7).

Im Gegensatz zu dieser Hypothese von Broach et al. (1979) konnte die andere Annahme, die Prozessierung größerer Primärtranskripte, erhärtet werden. Erstens wurden drei definierte Transkripte der 2µm-DNA von etwa 6 bis 12kb Länge gefunden (Abb.3). Sie sind wesentlich größer als die von Broach postulierten Primärtranskripte (etwa 4,8-5kb) und müßten mindestens einmal bis fast zweimal die Länge der 2µm-DNA umfassen. Da die Intensität der drei Banden etwa gleich ist, ergibt sich die Schwierigkeit, die Termination der Transkription zu erklären, da die RNA-Polymerase für die beiden längeren RNAs die Terminationssequenz mindestens einmal passieren muß, ohne die Transkription zu beenden. Zweitens wurden mit 2µmLEU2-DNA zwei gespleißte RNAs nachgewiesen, die von mindestens 4,8kb langen Vorläufern abstammen müssen (s. 5.2). Es ist zwar möglich, die Entstehung dieser Vorläufer-RNAs als Folge einer gestörten Transkriptionstermination durch Insertion des LEU2-Fragments anzusehen. Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine gestörte Termination auf der 2µmLEU2-DNA, insbesondere ist die Transkriptionskarte außerhalb des LEU2-Bereichs unverändert und es treten keine anderen großen RNAs auf. Deshalb scheint mir die Annahme großer Primärtranskripte als normale Produkte des Transkriptionsvorgangs auch von 2µm-DNA plausibler. Die Entstehung aller kleineren RNAs kann dann eine Folge von Prozessierungs- und im Falle der 2µmLEU2-DNA auch Spleißungsschritten sein. Drittens wurden in Hefestämmen mit pJDB219 oder pL610/616 mehrere häufige RNAs gefunden, die sich nicht als Folge eines kontinuierlichen Transkriptionsvorgangs erklären lassen (s. 3.7). Ihre wahrscheinlichste Erklärung ist meines Erachtens die Annahme,

daß die Transkription dieser RNAs nicht im monomeren Plasmid stattfindet, sondern in einem dimeren Zustand (s. 5.3). Diese Hypothese sollte man auch auf die endogene 2µm-DNA übertragen können, obwohl es möglich wäre, daß für die Transkription dieser Rekombinantplasmide in Hefe ganz eigene Regeln gelten. In solchen dimeren 2µm-DNA-Molekülen kann man je nach Orientierung der Segmente zueinander die Entstehung von RNAs bis 12,6kb Länge formulieren, ohne die Annahme machen zu müssen, daß die RNA-Polymerase ein Terminationssignal unbeeinflußt passiert. Somit ist die Entstehung der 11 Transkripte der 2µm-DNA durch Prozessieren großer Primärtranskripte recht wahrscheinlich. Das von Broach et al. (1979) angegebene Prozessierungsschema paßt allerdings nicht mehr auf den Prozessierungsvorgang, der für diese wesentlich größeren Primärtranskripte notwendig ist.

Es ist interessant, daß die 5'-Enden verschiedener RNAs des S-Segments an unterschiedlichen Stellen in den IR-Elementen 1 und 2 liegen. Trotz identischer Sequenzen der IR-Elemente scheint es darin für die 5'-Enden der Transkripte -anders als für die 3'-Enden!- doch Unterschiede zu geben, die wohl auf die Konformation der DNA oder RNA zurückzuführen sind. In die gleiche Richtung deutet das Ergebnis von Royer und Hollenberg (1979), die in IR1 eine Bindungsstelle für RNA-Polymerase aus E.coli nachgewiesen haben, welche in IR2 nicht vorkommt. Allerdings scheint es sich nach den oben besprochenen Ergebnissen, die auf Prozessierung langer Primärtranskripte hindeuten, bei diesen 5'-Enden nicht um Initiationsstellen der Transkription zu handeln. Man muß stattdessen eher unterschiedliche Prozessierungsstellen annehmen, die durch unterschiedliche Faltung der RNA im Bereich der IR-Elemente entstehen. An einer dieser Stellen in IR1 sollte die 2770b- und eventuell 2430b-RNA und an der anderen in IR2 die 1280b-, 930b- und eventuell 1580b-RNAs beginnen. Es ist unklar, weshalb sich keine

dieser Startpunkte mit dem von Breunig et al. (1982) bei NT355 kartierten deckt. Die Abweichung von mindestens 50bp kann nicht mehr durch Messungenauigkeit erklärt werden.

5.2 Transkription der 2µmLEU2-DNA im Hefestamm YT6001

Die 2µmLEU2-DNA unterscheidet sich von der 2µm-DNA durch die Insertion eines LEU2-Fragments mit dem Allel leu2-d. Dieses Allel wird sehr schwach exprimiert (weniger als 5% vom Wildtyp, weil ihm bis auf 29bp vor dem ATG-Startcodon alle 5'-nicht-codierenden DNA-Sequenzen fehlen (Erhart, 1983), in denen der Promotor und die regulatorisch wirkenden Elemente vermutet werden (Andreadis et al., 1982). Trotzdem wird leu2-d wie das Wildtyp-Allel noch durch Leucin und Threonin reprimiert (Erhart, 1983).

Im Hefestamm YT6001 (cir°) mit 2µmLEU2-DNA sind wesentlich mehr Transkripte dieses Plasmids als im Hefestamm H1 Transkripte endogener 2µm-DNA enthalten. Da die Kopienzahl der 2µmLEU2-DNA und der 2µm-DNA in diesen Stämmen gleich groß ist und auch die Halbwertszeiten der RNAs sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden sollten, kann man auf eine etwa 20fach höhere Transkriptionsaktivität der 2µmLEU2-DNA schließen. Alle Transkripte der 2µm-DNA, die in 5.1 besprochen wurden, sind in YT6001 vorhanden, sofern sie nicht von dem Bereich abgelesen werden, in dem LEU2 insertiert wurde. Daher fehlen nur die 1600b- und 700b-RNAs der 2µm-DNA. Sogar die Mengenverhältnisse der einzelnen Transkripte der 2µm-Sequenzen sind in YT6001 und H1 gleich. Die RNAs der Gene FLP, REP1 und REP2 und das 1280b-Transkript unbekannter Funktion sind neben den vier neuen RNA-Spezies der LEU2-Region mit 3030b, 1780b, 1670b und 1470b Länge die Haupttranskripte der 2µmLEU2-DNA (s. Abb.9). Dies zeigt ganz deutlich, daß durch die Insertion die Transkriptionsvorgänge auf

der 2µmLEU2-DNA wohl intensiviert, in ihrer übrigen Charakteristik aber nicht verändert werden.

Die 3030b- und 1780b-RNAs enthalten Sequenzen des LEU2-Gens und der benachbarten Bereiche des L-Segments der 2µm-DNA. Zusätzlich wurde in "Northern"-Experimenten eine Hybridisierung dieser beiden RNAs mit Teilen des S-Segments festgestellt. Dies war überraschend, weil diese Sequenzen zu weit auseinanderliegen, um Teil eines RNA-Moleküls von 3030b bzw. 1780b Länge zu sein. Die Erklärung durch zwei 3030b- und zwei 1780b-RNAs ist nicht möglich, da die Homologie im S-Segment nicht so weite Bereiche umfaßt, daß RNAs dieser Größe dort kartiert werden könnten. Eine Kreuzhybridisierung der spezifischen ^{32}P-DNA-Proben mit anderen Bereichen der 2µm-DNA könnte durch Kontamination der Proben mit anderen Fragmenten hervorgerufen oder mit Sequenzhomologien innerhalb der 2µm-DNA erklärt werden. Beide Erklärungen wurden dadurch widerlegt, daß Kreuzhybridisierung sowohl bei den Markerfragmenten der 2µm-DNA wie bei anderen RNAs aus den gleichen Bereichen der 2µm- und 2µmLEU2-DNA ausgeschlossen wurden. Auch wurden bisher keine derartigen Sequenzhomologien in der 2µm-DNA beschrieben. Da die anderen Möglichkeiten ausgeschlossen werden konnten, bleibt nur die Erklärung, daß die 3030b- und 1780b-RNAs nicht kontinuierlich transkribiert werden, sondern jeweils aus zwei Teilen bestehen, die aus einer größeren Vorläufer-RNA herausgeschnitten und zusammengespleißt werden (Abb.29). Damit ist ein direkter Beweis für die Existenz großer Primärtranskripte (mindestens 4,8kb lang) erbracht. Da es keine Hinweise auf eine gestörte Transkription der 2µm-Sequenzen von 2µmLEU2-DNA gibt (s.o.), kann man annehmen, daß solche großen Transkripte nicht nur in YT6001 existieren, sondern ein Charakteristikum der 2µm-DNA sind (s. 5.1).

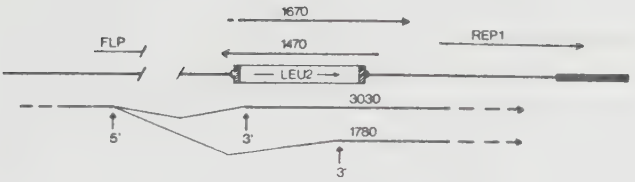


Abb.29: Transkription des LEU2-Fragments
Dargestellt ist ein Teil des L-Segments von 2µmLEU2-DNA mit dem LEU2-Fragment und links ein Stück des S-Segments; schraffiert: nicht-translatierte Bereiche von LEU2 und dA/dT-Linker; Lage und Richtung der RNAs ist durch waagerechte Pfeile angegeben; senkrechte Pfeile geben die Spleißstellen an,die durch abgewinkelte Linien verbunden sind.

Da die 5'-Donor- und 3'-Akzeptorstelle dieses Spleißvorgangs im LEU2-Fragment und im S-Segment liegen, handelt es sich um zwei nicht zueinandergehörende Stellen. Deshalb hat dieses Spleißen Ähnlichkeit mit dem verschiedentlich beobachteten "falschen" Spleißen, das bei einer mutierten Spleißstelle zwischen der intakten und einer "kryptischen" Stelle stattfindet (Felber et al., 1982, Treisman et al., 1982, Wieringa et al., 1983). Es stellt sich nun die Frage, welches die intakte Spleißstelle ist, die selbst oder mit einer benachbarten Signalsequenz den Spleißvorgang auslöst und welches die fälschlicherweise benutzte, kryptische Stelle ist. Da für Transkripte der 2µm-DNA Spleißvorgänge sehr unwahrscheinlich sind und nur solche mit kleinen Introns nicht völlig ausgeschlossen werden konnten, in YT6001 aber ein sehr großräumiges Spleißen stattfindet, liegt sehr wahrscheinlich das auslösende Signal dafür im LEU2-Fragment.

Zur Unterstützung dieser Hypothese wurde in der Sequenz des intakten LEU2-Gens nach möglichen Spleißstellen gesucht, die den bekannten Consensus-Sequenzen (Breathnach & Chambon, 1981; Mount, 1982) ähneln. Obwohl in Hefe Introns anderer Organismen nicht korrekt gespleißt werden (Beggs et al., 1980; Langford et al., 1983), ist dieser Ansatz berechtigt, da die bisher bekannten Hefe-Spleißstellen

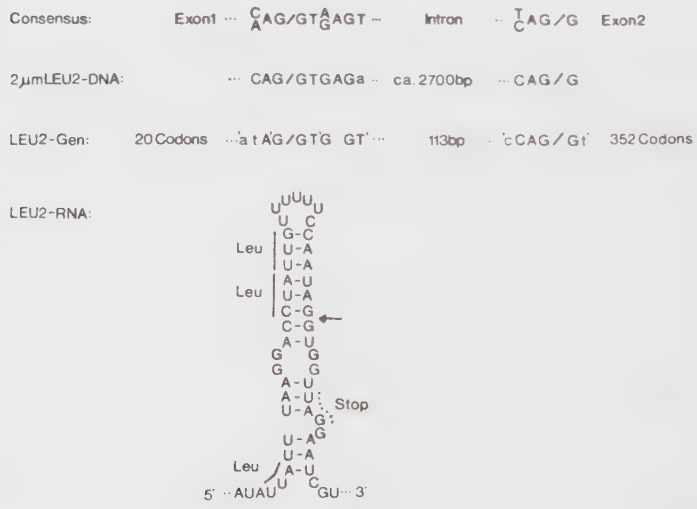


Abb.30: Spleißstellen im LEU2-Gen.
1. Zeile: Consensus-Sequenz der Spleißstellen (Mount, 1982); links die 5'-Donor-, rechts die 3'-Akzeptorstelle; Schnittstellen sind durch Schrägstriche markiert; die Sequenz ist von 5' (links) nach 3' (rechts) geschrieben. 2. Zeile: vermutete Spleißstellen in 2µmLEU2-DNA; links: kryptische Donorstelle in 2µm-DNA bei NT5651; rechts: Akzeptorstelle im LEU2-Gen (s.u.); die Leseraster sind durch ' markiert. 3. Zeile: vermutete Spleißstellen im LEU2-Gen; links: Donorstelle im 22. Codon des kleinen Leserahmens; rechts: Akzeptorstelle im 12. Codon des großen Leserahmens; unten: Sekundärstruktur der LEU2-RNA im Bereich der 5'-Donorstelle; markiert sind die drei Leucin- und das Stop-Codon des kleinen Leserahmens und die Spleißstelle (Pfeil).

mit den Consensus-Sequenzen übereinstimmen (Gallwitz & Sures, 1980; Ng & Abelson, 1980). Bei diesem Sequenzvergleich bestätigte sich die vermutete Analogie zu falschen Spleißereignissen: Im codierenden Bereich des Leucin-reichen Peptids aus 23 Aminosäuren, das 80bp vor dem vermuteten Startcodon des Leserahmens für β-Isopropylmalat-Dehydrogenase (β-IPM-DH) liegt, befindet sich im vorletzten Codon eine Stelle, die als 5'- Donorstelle in Frage kommt (Abb.30). Eine zur Consensus-Sequenz der 3'-Akzeptorstelle ähnliche Sequenz ist im zwölften Codon des vermutlichen β-IPM-DH-Leserahmens vorhanden. Das Spleißen der RNA des intakten LEU2-Gens an diesen beiden Stellen würde den großen und kleinen Leserahmen im gleichen Raster zusammenbringen.
Falls diese beiden Stellen in vivo tatsächlich als Spleißstellen verwendet werden, kann man die 3030b-RNA von 2µmLEU2-DNA als Produkt eines falschen Spleißens ansehen, da im leu2-d Allel nur die 3'-Akzeptor-Spleißstelle übrig ist. Dabei wird in einer Vorläufer-RNA eine -vermutlich kryptische- 5'-Donorstelle im S-Segment der 2µm-DNA an die 3'-Akzeptorstelle des LEU2-Fragments gespleißt. Eine genaue Lokalisierung der 5'-Donorstelle war nicht möglich. Es kommt zum Beispiel die Sequenz bei NT5651 in Frage, die zu einem Zusammenspleißen der Leserahmen des FLP- und des LEU2-Gens im richtigen Raster führen würde. Die Entstehung der 1780b-RNA ist etwas schwieriger zu erklären, da sie nicht die ganze LEU2-Sequenz enthält und daher vermutlich durch Spleißen über eine andere Akzeptorstelle entsteht. Eine Möglichkeit wäre zum Beispiel, daß eine besser zur -falschen- Donorstelle passende Akzeptorstelle gegen Ende der LEU2-DNA verwendet wird. Das deutet darauf hin, daß auf dem Primärtranskript ein von der 3'-Akzeptorstelle unabhängiges Signal liegt, das zum Spleißen dieser RNAs führt. Die gespleißten RNAs können nur aus großen Vorläufer-RNAs von mindestens 4,8kb Länge entstehen. Quantitatives Spleißen dieser RNAs in der postulierten Weise verhindert die Entstehung der 1420b-

und 1280b-RNAs. Da diese jedoch in YT6001 in größerer Menge gefunden werden, entstehen sie entweder nicht aus einem Primärtranskript, das gespleißt werden kann, oder das Spleißen findet in Konkurrenz zum Prozessieren statt und liefert ähnliche Mengen reife RNA.

Falls diese Erklärung der Spleißvorgänge in Transkripten der 2µmLEU2-DNA richtig ist, bedeutet dies, daß das LEU2-Gen ein Intron enthält. Das erste Exon besteht aus 64bp gefolgt von einem Intron mit 121bp und dem zweiten Exon aus 1058 bp. Darüber hinaus enthält diese Hypothese eine interessante Perspektive für die Regulation des LEU2-Gens: Da die 5'-Donor-Sequenz in einer Haarnadelstruktur mit ΔG = 12,3 kcal/ mol vorliegen kann (Andreadis et al., 1982),könnte sie unter bestimmten Umständen -sinnvollerweise bei ausreichender Leucin-Konzentration im Cytoplasma- auf diese Weise vor dem Spleißen geschützt und im Cytoplasma zu einem Peptid aus 23 Aminosäuren translatiert werden. Im Fall der Induktion des LEU2-Gens bei Leucin-Mangel könnte diese Sekundärstruktur dagegen destabilisiert und dadurch die Donorstelle für das Spleißen zugänglich gemacht werden, wodurch die Synthese der β-IPM-Dehydrogenase möglich wird. Bevor dieser Regulationsmechanismus des LEU2-Gens über die Zugänglichkeit von Spleißstellen weiter diskutiert werden kann, müssen allerdings zuerst weitere Untersuchungen die Verwendung dieser Spleißstellen in vivo beweisen.
Für die Expression des LEU2-Gens in 2µmLEU2-DNA kommt einmal die 3030b-RNA in Frage, falls das Spleißen tatsächlich zu einem fusionierten Leserahmen führt. Die sehr schwache Expression des Allels leu2-d könnte dann auf das Fehlen der 22 Aminosäuren des ersten Exons zurückzuführen sein oder die 27 N-terminalen Aminosäuren aus dem FLP-Protein setzen die Aktivität der β-IPM-Dehydrogenase herab. Es läge hier der kuriose Fall vor, daß ein kloniertes Stück eines Gens, das durch eine Deletion defekt

ist, aufgrund dieser Deletion falsch gespleißt und dadurch wieder exprimiert wird. Ansonsten könnte die 1670b-RNA wegen ihrer Lage und Richtung das funktionelle Transkript des LEU2-Gens sein (Abb.29). Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß noch eine andere wesentlich seltenere RNA vorhanden ist, die die geringe Aktivität des Allels leu2-d erklären könnte. Die 1670b-RNA beginnt in der unmittelbaren Umgebung der Insertionsstelle des LEU2-Fragments. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob ihr 5'-Ende in der Sequenz der 2µm-DNA, dem poly(dT)-Linker oder in den verbliebenen 29bp des LEU2-Gens liegt. Vermutlich reichen die 29bp allein für den Transkriptionsstart nicht aus und Sequenzen der 2µm-DNA müssen daran beteiligt sein. Am wahrscheinlichsten ist, daß die 1670b-RNA das Produkt einer abortiven Spleißreaktion ist, bei der zwar geschnitten, aber nicht gespleißt wird. Eine Initiation der Transkription oder das Prozessieren, beides in der Umgebung der Insertionsstelle, sind andere Möglichkeiten, die nicht ausgeschlossen werden können. Falls die 1670b-RNA die mRNA des leu2-d-Allels ist, könnte ein Grund für die sehr schwache Expression das artifizielle 5'-Ende dieser RNA sein, die -vielleicht durch fehlende 5'-Cap-Struktur- schlecht translatiert wird. Entsteht die 1670b-RNA durch'abortives Spleißen', so kann sie sicher nicht in β-IPM-Dehydrogenase translatiert werden, da der Translationsstart im falschen Raster liegen würde. Das Ende des 1250bp großen LEU2-Fragments in 2µmLEU2-DNA ist nicht genau bekannt, doch liegt es vermutlich nur etwa 80 ± 30bp hinter dem Ende des Leserahmens im Bereich der Consensus-Sequenz für das 3'-Ende von Hefe-mRNA (Zaret et Sherman, 1982). Deshalb fehlt die normale Termination, und die 1670b-RNA ist am 3'-Ende etwa 400b länger als die mRNA des intakten LEU2-Gens (Andreadis, pers. Mitt.).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß bei gleicher Kopienzahl des Plasmids die Transkription der ganzen 2µmLEU2-DNA in Abwesenheit von Leucin etwa 20fach erhöht ist gegenüber 2µmLEU2-DNA in H1. Damit ist gezeigt, daß die LEU2-Regulation direkt auf die RNA-Menge in der Hefezelle einwirkt. Da von diesem Effekt auch die Transkripte reiner 2µm-Sequenzen betroffen sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß die Regulation der Expression des LEU2-Fragments durch Stimulation der Transkription stattfindet und nicht etwa durch Veränderung der Halbwertszeit der LEU2-Transkripte. Diese koordinierte Regulation aller Transkripte ist in Übereinstimmung mit dem Modell der Prozessierung von großen Primärtranskripten.

Eine Regulation des leu2-d-Allels ist wegen der Deletion fast der gesamten 5'-nicht-translatierten Sequenzen nur schwer zu erklären. Da die von Andreadis et al. (1982) vermuteten Kontrollelemente alle fehlen, kann es sich nur um interne Sequenzen des LEU2-Strukturgens handeln, auf die Effektoren einwirken, die von anderen Genorten (Kohlhaw, 1982) oder aus der Umgebung des mutierten LEU2-Gens auf Chromosom III herrühren. Eine derartige interne Operatorsequenz ist erst vor kurzem für das Gal-Operon in E.coli beschrieben worden (Irani et al., 1983). Wegen der gemeinsamen Regulation aller RNAs von 2µmLEU2-DNA muß das Kontrollelement im LEU2-Gen über große Distanzen hinweg wirken. Dies gilt unabhängig davon, ob die hier vertretene These der Regulation der Transkription großer Primärtranskripte richtig ist, oder ob alle beobachteten RNAs separat transkribiert und reguliert werden. Damit der interne Operator des LEU2-Gens auch die Transkription ausgehend von Promotoren der 2µm-DNA stimulieren kann, muß seine Wirkung unspezifisch sein. Dafür kommen eigentlich nur topologische Effekte in Frage, die durch Änderung der Torsionsspannung im Plasmid (Lilley, 1981a) oder der Verteilung der Nucleosomen auf der DNA ("nucleosome phasing")

(Nasmyth, 1982) unspezifisch über große Distanzen wirken können. Ähnliche Effekte wurden bei einer 72bp großen "enhancer"-Sequenz von SV40 (Banerji et al., 1981; Moreau et al., 1981) gefunden und in anderen Systemen bestätigt (Smith, 1981; Lilley, 1981b; Carnevali et al., 1983). Da die Transkription der 2µmLEU2-DNA unter nicht-selektiven Bedingungen ähnlich schwach ist wie die der 2µm-DNA, ihre Transkription unter selektiven Bedingungen dagegen erhöht ist, handelt es sich wohl um eine positive Regulation des LEU2-Gens.

5.3 Transkription rekombinanter Derivate von 2µm-DNA in Hefe

Die hier untersuchten Plasmide pJDB219 (Beggs, 1978), pL610 und pL616 (Erhart, 1983) können als Derivate der 2µmLEU2-DNA angesehen werden, die über die EcoRI-Schnittstelle im S-Segment in die bakteriellen Vektoren pMB9 bzw. pBR325 integriert wurde. Da diese Plasmide in cir°-Hefestämmen nicht invertieren können, sollte man aus den transformierten Hefen nur die Transkripte einer definierten Form ihres 2µm-DNA Teils erhalten und so den Einfluß des Typs auf die Transkription untersuchen können.

Von den genannten Rekombinantplasmiden werden bis auf die RNAs im Bereich der Insertionsstelle alle von 2µmLEU2-DNA bekannten Transkripte abgelesen. Zusätzlich treten große RNAs bis etwa 6kb auf, die aufgrund ihrer Homologien ähnlich wie die 3030b- und 1780b-RNAs gespleißt sein müssen (Abb.14). Da eine genaue Kartierung dieser RNAs nicht möglich war, kann über den Weg ihrer Entstehung keine exakte Aussage gemacht werden. Ein Ende ihrer beiden zusammenhängend transkribierten Teile liegt jeweils in der Nähe der vermuteten 3'-Akzeptorstelle im LEU2-Gen. Es liegt deshalb nahe, diese Stelle auch mit dem Spleißen dieser RNAs in Verbindung zu bringen. Da es sich hier um wesentlich größere RNAs handelt, die in zwei Gruppen zusammengefaßt werden können, je nachdem auf welcher Seite der 3'-Akzeptorstelle sie hybridisieren, lassen sie sich nicht mehr mit einem einfachen Spleiß-Modell wie die 3030b- und 1780b-RNAs von YT6001 erklären.

Das überraschendste Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß sich die Bandenmuster von Stämmen mit Plasmiden unterschiedlichen 2µm-Typs nicht unterscheiden. Dies gilt für die Stämme mit pL610 (Typ 23) und pL616 (Typ 14) uneingeschränkt und für die beiden Stämme mit pJDB219,

YT200 (cir^+; pJDB219 (14+23)) und YT210 (cir^0; pJDB219 (14)), wenn man berücksichtigt, daß in YT200 durch Rekombination zwischen 2µm-DNA und pJDB219 2µmLEU2-DNA entstanden ist. Von dieser werden in YT200 die zusätzlichen 1280b- und 1420b-RNAs transkribiert.

Das Auftreten aller RNAs unabhängig vom Typ des Plasmids bedeutet für die Gene der 2µm-DNA, daß sie sicher nicht durch die Inversion von Segmenten der 2µm-DNA reguliert werden, wie von Broach et al. (1979) postuliert worden ist. Für die großen RNAs der Rekombinantplasmide bedeutet dies jedoch, daß ihre Entstehung durch Transkription der singulären Plasmide nicht erklärt werden kann auf der Basis bisher bekannter Mechanismen. Wenn die gleiche RNA von beiden Plasmiden transkribiert wird, die sich durch Inversion eines Segments unterscheiden, und diese RNA Sequenzen aus beiden Segmenten enthält, kann man dies nur dadurch erklären, daß ein Primärtranskript Sequenzen beider Einzelstränge enthält. Dies müßte entweder durch einen Wechsel der DNA-Matrize bei der Transkription oder durch Zusammenspleißen zweier getrennt transkribierter RNAs entstanden sein.

Als wesentlich plausiblere Alternative bietet sich die Transkription von Di- oder Oligomeren der Rekombinantplasmide an. Läßt man zuerst einmal außer acht, daß die flp-Rekombinantplasmide in cir^0-Hefen nicht rekombinieren können und nach bisherigen Vorstellungen daher auch keine Multimeren bilden sollten, so bietet sich zur einfachen Erklärung dieses Phänomens die Transkription eines dimeren Plasmids an, in dem der Plus-Strang des einen Monomeren mit dem Minus-Strang des anderen verknüpft ist (Abb.31A). Dieses Molekül enthält deshalb auf jedem Einzelstrang alle Sequenzen beider Stränge. Man kann es sich formal zum Beispiel durch Rekombination von zwei Plasmiden gleichen Typs über nicht entsprechende IR-Elemente entstanden denken.

Ein RNA-Molekül, das durch Transkription eines ganzen Einzelstrangs eines solchen Plasmids entstanden ist, enthält die gesamte Information von beiden DNA-Strängen des Plasmids. Aus diesem Primärtranskript lassen sich durch Prozessierungs- oder Spleißreaktionen alle beobachteten RNAs widerspruchsfrei erklären. Für die Rekombinantplasmide müssen solche Primärtranskripte von Dimeren angenommen werden, da man nur so die großen gespleißten RNAs erklären kann, ohne gegen feste Regeln der Transkription zu verstoßen oder eine neue Art des Spleißens einführen zu müssen. Da auch für 2µmLEU2-DNA Primärtranskripte gefordert werden und für 2µm-DNA drei RNAs nachgewiesen wurden, von denen die größte fast die Länge dimerer 2µm-DNA hatte, sollte auch die Transkription der 2µm-DNA und 2µmLEU2-DNA auf diesem Weg erfolgen.

Da in 2µm- und 2µmLEU2-DNA nur die Umgebung des Replikationsursprungs frei von Transkripten ist, bietet sich das einfache Modell an, in dem ein Promotor auf der einen und ein Terminator auf der anderen Seite diesen Bereich umschließen (Abb.31). Promotor und Terminator bewirken die Initiation bzw. Termination der Transkription in der gleichen Richtung. Wegen dieser Polarität des Terminators wird die Transkriptionsrunde im beschriebenen Dimer nicht durch den zweiten Terminator in der anderen Untereinheit gestoppt, da dieser umgekehrt orientiert ist. Somit ist die Transkription in diesem Dimer erst nach einer fast vollständigen Transkriptionsrunde zu Ende. In H1 würde dieses Transkript der größten der drei Vorläufer-RNAs entsprechen. Im anderen Dimer (Abb.31B) -formal entstanden zum Beispiel durch Rekombination zweier Plasmide gleichen Typs über die entsprechenden IR-Elemente- endet die Transkription dagegen schon beim Terminator des anderen Monomoren, da hier beide Promotoren und Terminatoren gleiche Orientierung haben. Die resultierende RNA hat etwa die Länge eines Monomeren und könnte in H1 die kürzeste

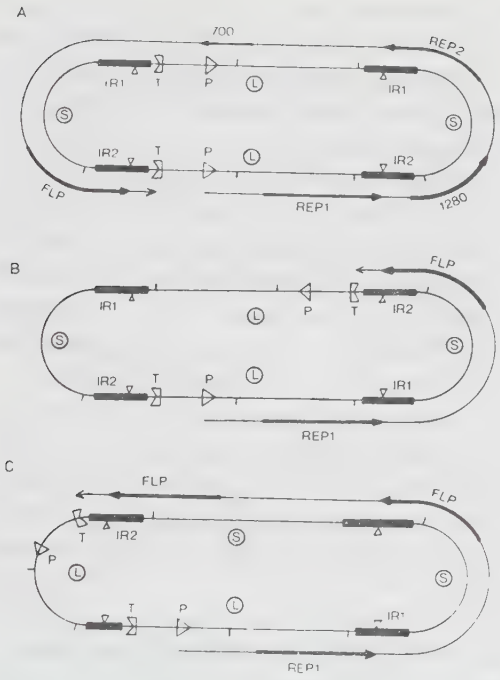


Abb.31: Transkriptionsaktive dimere 2µm-DNA-Moleküle. Dargestellt sind drei Typen dimerer 2µm-DNAs, die zur Erklärung der drei großen RNAs führen.
A: Dimer, von dem die 12kb-RNA transkribiert wird.
B: Dimer, von dem die 6kb-RNA transkribiert wird.
C: unorthodoxes Dimer, in dem zwei abnorme IR-Elemente auftreten (Royer & Hollenberg, 1977), von dem eine ca. 9kb-RNA transkribiert wird. Dargestellt sind jeweils innen die Plasmide mit den L- und S-Segmenten und den IR-Elementen (schwarze Blöcke), den hypothetischen Promotoren (P) und Terminatoren (T). Promotoren und Terminatoren wirken nur in einer Richtung (angedeutet durch Pfeilspitze von P und V-förmigen Ausschnitt von T). Ihre Lage und Richtung ist unbekannt, sie wurde hier zur Demonstration analog zu Broach et al. (1979) angenommen. Ferner sind angegeben die Prozessierungsstellen in den IR-Elementen (Dreiecke) und die HindIII-Schnittstellen (Striche). Außen ist jeweils eines der beiden möglichen Primärtranskripte eingezeichnet und die möglichen Endprodukte seiner Prozessierung (dicke Pfeile).

der drei großen Vorläufer-RNAs sein. Die mittlere der sehr großen RNAs in H1 kann so nicht erklärt werden. Sie könnte eventuell ein entsprechendes Transkript von einem Dimeren sein, in dem jeweils zwei gleiche Segmente (2L und 2S) aneinanderstoßen. Solche Dimere und höhere Oligomere wurden von Royer und Hollenberg (1977) beschrieben. Derartige Strukturen scheinen unter Dimeren häufiger zu sein als unter monomeren 2µm-DNAs, bei denen sie zusammen etwa 16% ausmachen. Die geringe Menge der 2µm-Transkripte in der Hefezelle läßt sich durch das Modell der Transkription von Dimeren gut erklären. Die Dimere machen etwa 5-10% (Guerineau et al., 1976) bis 20% (Petes & Williamson, 1975) der Hefeplasmide mit Homologie zur 2µm-DNA aus. Nimmt man an, daß eine Kontrolle existiert, die nur die Transkription von Dimeren erlaubt, so wäre aufgrund der berechneten RNA-Mengen die Transkription jedes dieser transkriptionsaktiven Moleküle einmal pro Zellzyklus möglich.

Die einzige Problematik, die diese Erklärung der Transkription der 2µm-DNA aufwirft, hängt mit der Entstehung der Dimere zusammen. Anlaß zu ihrer Postulierung war die Transkription von flp-Plasmiden in cir°-Hefestämmen. In diesen Stämmen kann jedoch keine FLP-abhängige Rekombination stattfinden. Deshalb hätten die Dimere nach bisheriger Anschauung nur über allgemeine Rekombination entstehen können und sollten bei ausschließlich mitotischen Teilungen selten sein. Da kein Unterschied in der RNA-Menge zwischen Flp^+- und Flp^--Stämmen festgestellt wurde, sind entweder die Dimere nicht nötig für die Transkription oder ihre Entstehung ist auch FLP-unabhängig relativ häufig. Da man zur Erklärung der vorliegenden Daten das Modell der Transkription von Dimeren unbedingt benötigt, glaube ich, daß dieses Argument ausreicht, einen anderen Mechanismus für die Entstehung der Dimere zu fordern. Demnach entstehen diese Moleküle in einem häufigen

FLP-unabhängigen Prozeß aus Monomeren eines Typs und können eventuell wieder in Monomere zerfallen, FLP-unabhängig aber nur in Monomere des Typs aus dem sie entstanden sind. Dann wäre die FLP-Funktion nur erforderlich für den Zerfall der Dimere in Monomere des anderen Typs. Das FLP-Protein ist in diesem Modell also nur nötig, um im dimeren Plasmid die intramolekulare Rekombination zwischen IR-Elementen durchzuführen. Dabei müßte es die Rekombination über dasjenige Paar von IR-Elementen ermöglichen, das bei der Entstehung der Dimeren nicht rekombiniert hat.

5.4 Transkriptionsmodell der 2µm-DNA in Hefe

Aus den Ergebnissen, die in 5.1 bis 5.3 diskutiert wurden, ergibt sich ein Modell für die in vivo-Transkription der 2µm-DNA im Hefestamm H1, das hier als Hypothese zusammengefaßt wird.

2µm-DNA(H1): Etwa 10% der 2µm-DNA-Moleküle liegen in der Hefezelle als Dimere oder Oligomere vor. Sie stellen die transkriptionsaktive Form der 2µm-DNA dar und liefern die Hauptmenge ihrer Transkripte in Form von 6 bis 12kb großen Primärtranskripten. Von den drei beobachteten Primärtranskripten können nur das größte und kleinste als Produkt der verschiedenen Dimere normaler 2µm-DNA erklärt werden. Die RNA mittlerer Größe muß von Dimeren stammen, in denen zwei L- und zwei S-Segmente aneinandergrenzen (Royer & Hollenberg, 1977). Seine Entstehung ist unverstanden. Alle Dimere müssen FLP-unabhängig gebildet werden können.

Das Monomer der 2µm-DNA enthält einen Promotor und einen Terminator. Sie wirken beide polar und liegen Rücken an Rücken in der Umgebung des Replikationsursprungs. Dadurch entsteht dort ein Bereich, der im Dimeren nur aus-

gehend vom Promotor der anderen Untereinheit transkribiert werden kann, da die Transkription dann entgegen der Funktionsrichtung des Terminators stattfindet (Abb.31). Sequenzen dieses Bereichs treten in den reifen RNAs von H1 und YT6001 nicht auf. Über die Lage des Promotors und Terminators auf der 2µm-DNA ist keine Aussage möglich. In Abb.31 wurde sie so gewählt, daß sich der zwischen Promotor und Terminator liegende Bereich mit dem in reifer RNA nicht auftretenden Bereich der 2µm-DNA deckt. Aus den großen Primärtranskripten werden die reifen RNAs herausgeschnitten. Für das Entstehen von 3'-Enden sind vor allem die bäumchenartigen Sekundärstrukturen verantwortlich, die sich auf der RNA im Bereich der Sequenzen aus den IR-Elementen bilden. Ein Teil der selteneren RNAs (2770b, 2430b und eventuell 2040b) könnten als Zwischenstufen der Prozessierung angesehen werden. Die anderen Intermediärprodukte und die Abfallstücke treten nicht in feststellbaren Mengen auf. Hinweise auf Spleißreaktionen in Transkripten der 2µm-DNA gibt es keine. Das Herausschneiden größerer Introns kann ausgeschlossen werden, eventuell könnten kleinräumige Spleißereignisse stattfinden.

Dieses Modell knüpft an die These von Broach et al. (1979) an, in der die Prozessierung von Primärtranskripten gefordert wurde. Es basiert jedoch auf anderen Daten und unterscheidet sich in allen Details, wie transkribierte Moleküle, Länge der Primärtranskripte und den Prozessierungsschritten von diesem. Für die Funktion der Inversion von Segmenten der 2µm-DNA ergibt sich genau das Gegenteil der postulierten Genregulation (op. cit.): Die Transkription läuft so ab, daß der Typ der 2µm-DNA keinen Einfluß auf die Genexpression hat.

2µmLEU2-DNA(YT6001): Die Insertion des LEU2-Fragments in die PstI-Stelle der 2µm-DNA verändert die primäre Transkription nicht wesentlich. Allerdings bewirkt dieses DNA-Fragment eine induzierbare drastische Erhöhung der Transkription. Außerdem wird durch eine singuläre 3'-Spleißakzeptorstelle und eventuell ein weiteres Spleißsignal ein Spleißereignis induziert. Dabei wird in Konkurrenz zur Prozessierung im Primärtranskript oder einer ausreichend großen Zwischenstufe eine kryptische 5'-Donorstelle im S-Segment an die Akzeptorstelle des LEU2-Gens gespleißt.

Rekombinantplasmide: Die Insertion bakterieller DNA in die EcoRI-Schnittstelle im S-Segment der 2µm-DNA hat stärkeren Einfluß auf das Bandenmuster der Transkripte. Vermutlich durch Beeinträchtigung der Prozessierung entsteht eine große Anzahl großer RNAs, die gespleißt sind, aber nicht oder nicht schnell genug zu Ende prozessiert werden konnten. Davon ist jedoch die Entstehung der mRNAs der REP-Gene von 2µm-DNA nicht betroffen.

Dieses Transkriptionsmodell stützt sich auf eine Reihe von Befunden, die in 5.1 bis 5.3 besprochen wurden, die es jedoch nicht beweisen. Zur Überprüfung des Hauptpunktes, der Transkription von Dimeren, können folgende Voraussagen des Modells dienen: (1) Die Häufigkeit von Dimeren der 2µm-DNA wird in Hefe nicht durch die FLP-Aktivität erhöht. (2) Der Bereich zwischen Terminator und Promotor kann nur in einer Richtung transkribiert werden. RNAs aus Hefestämmen mit Rekombinantplasmiden (pJDB219 u.a.) dürfen in diesem Bereich nur gegen einen DNA-Einzelstrang hybridisieren. (3) Bei Plamiden, die keine Dimere bilden können, weil zum Beispiel die IR-Elemente defekt sind, fehlen alle Transkripte, die nach diesem Modell entstehen.

5.5 FLP-abhängige Rekombination in E.coli

Auf der Suche nach flp-Rekombinantplasmiden der 2µm-DNA, welche die bakterielle DNA in eine andere Stelle insertiert enthalten, wurden Plasmide vom Typ pG53BD konstruiert. Die Segmente des 2µm-DNA-Teils dieser Plasmide invertieren in $recA^-$-E.coli-Stämmen sehr effizient in der Art der FLP-abhängigen Rekombination von 2µm-DNA in Hefe. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Flp^+-Phänotyp durch die Fusion des Leserahmens A der 2µm-DNA in Phase an den Leserahmen A-179 des Tet^R-Gens von pBR325 erzeugt wird. Das so entstandene Tet-FLP-Gen erzeugt ein Fusionsprotein unter Kontrolle des Tet^R-Promotors. Der FLP-Teil dieses Proteins ist offensichtlich auch in der völlig anderen Umgebung in E.coli in der Lage, die spezifische Rekombination über IR-Elemente der 2µm-DNA zu bewirken. Es muß offengelassen werden, ob das Tet-FLP-Protein diese Reaktion allein durchführen kann, ob es dafür der Mitwirkung ubiquitärer Enzyme des DNA-Stoffwechsels bedarf oder ob es nur die IR-Elemente erkennt und in einen rekombinationsbereiten Zustand überführt, die Rekombination selbst aber von einem E.coli-eigenen Rekombinationssystem durchgeführt wird.

Das Fusionsprotein enthält fast 90% des Tet^R-Proteins. Es liegt deshalb wahrscheinlich wie das intakte Tet^R-Protein (McMurry et al., 1980) mit der Membran assoziiert vor. Unbekannt ist, ob dies für die FLP-Aktivität des Proteins erforderlich ist oder diese behindert oder blockiert. Im letzten Falle könnten geringe Mengen nicht in die Membran eingebauten Tet-FLP-Proteins die FLP-Aktivität erzeugen. Durch den Zusammenhang zwischen Fusion des Leserahmens A von 2µm-DNA an das Tet^R-Gen und den Flp^+-Phänotyp in E.coli ist bewiesen, daß der Leserahmen A der codierende Teil des FLP-Gens von 2µm-DNA ist, wie Broach und Hicks (1980) postuliert hatten.

Weitere Experimente zur FLP-Aktivität in E.coli sollten zeigen, ob sie auch wie postuliert in trans wirkt. Dazu wurden E.coli-Stämme untersucht, die in einer Zelle zwei verschiedene Plasmide mit 2µm-DNA enthielten. Die Koexistenz dieser Plasmide war nach Co- oder Supertransformation möglich, da sie kompatible Replikons und unterschiedliche Resistenzgene enthielten. Diese Experimente gaben auf experimentell sehr einfachem Wege Auskunft über die Rekombination der Plasmide in E.coli. Mit pG53BD als Träger des Tet-FLP-Gens und pK21 (Reipen, 1983) als flp-Testplasmid ergab sich eine hohe Rate der intermolekularen Rekombination zwischen beiden Plasmiden. Sie läßt sich leicht anhand von neu auftretenden Plasmiden mit ausgetauschten Segmenten (pG53BD-K21, s. 4.6.1) nachweisen. Da aber andererseits weder intra- noch intermolekular eine nennenswerte Rekombination der pK21-Moleküle unter sich stattfindet, wurde postuliert, daß sich die IR-Elemente in pG53BD und pK21 in der Rekombinationsbereitschaft unterscheiden. Dieses Modell nimmt an, daß auf pK21 zwei inaktive, auf pG53BD mindestens ein rekombinationsaktives IR-Element liegen. Zur effizienten Rekombination muß mindestens eines der IR-Elemente aktiv sein.

Da als Ort der Rekombination diejenige Sequenz im IR-Element identifiziert worden ist, die bäumchenartige Strukturen ausbilden kann (Broach & Hicks, 1980), liegt es nahe, Unterschiede in der Sekundärstruktur dieses Bereichs als Ursache für Rekombinationsbereitschaft oder -trägheit anzusehen. Wegen der identischen Sequenz aller IR-Elemente sollten diese Unterschiede durch Effekte hervorgerufen werden, die von anderen Teilen der Plasmide ausgehen. Über die Natur dieser cis-Effekte geben die besprochenen Experimente keinen Aufschluß, so daß nur Vermutungen aufgestellt werden können. Zum einen kommen dafür allgemeine topologische Einflüsse in Frage, die die Torsionsspannung erhöhen und damit das Entstehen haarnadelartiger Struk-

turen fördern (Lilley, 1981). Carnevali et al. (1983) konnten die Wirkung derartiger topologischer Einflüsse auf die Transkription nachweisen und es liegt nahe, sie auch für andere Prozesse wie Replikation und Rekombination anzunehmen (Gellert et al., 1977; Mizuuchi & Nash, 1976). Für das LEU2-Fragment wurde ein ähnlicher Effekt auf die Transkription nachgewiesen (5.2). Seine Beteiligung kann hier jedoch ausgeschlossen werden, da sich Plasmide mit (pJDB219) und ohne LEU2-Fragment (pK21, BTYP-1) in dieser Hinsicht gleich verhalten. Andererseits läßt sich die Aktivierung der IR-Elemente auch so erklären, daß Vorgänge in unmittelbarer Umgebung der Rekombinationsstellen stattfinden, die zu einer lokalen Änderung der Torsionsspannung führen. Dies könnte zum Beispiel durch Aufschmelzen und Entwinden der DNA-Helix in der Umgebung eines Transkriptionskomplexes oder einer Replikationsgabel sein. Für die Replikationsgabel müßte man zusätzlich eine bestimmte Richtung relativ zur Rekombinationsstelle forden, da natürlich die Rekombinationsstelle in jedem Plasmid von einer Replikationsgabel passiert wird. Obwohl keine der anderen Erklärungen ausgeschlossen werden kann, vertragen sich die Daten dieser Arbeit gut mit der Hypothese, daß die Transkription des Tet-FLP-Gens in E.coli das benachbarte IR-Element 1 aktiviert. Ob dieser cis-Effekt auf die FLP-abhängige Rekombination der 2µm-DNA auch in Hefe existiert, ist unbekannt.Aufgrund anderer Topologie der DNA durch Chromatinstruktur sowie aufgrund bidirektionaler Replikation und anderer Transkriptionsvorgänge (s. 5.4) ist denkbar, daß in Hefe dieser Einfluß der Nachbarschaft der IR-Elemente auf die Rekombinationsbereitschaft nicht beobachtet werden kann.

Der intermolekulare Ablauf der beobachteten Rekombinationen erschwerte den Nachweis der trans-Wirkung des FLP-Gens, da bei direktem Kontakt der Moleküle auch eine nur in cis wirkende FLP-Aktivität zur Erklärung der Vorgänge ausreichen könnte. Diese Möglichkeit wurde in der Literatur nicht berücksichtigt, da man trotz des häufigen intermolekularen Ablaufs der FLP-abhängigen Rekombination in Hefe (Gerbaud et al., 1979, Dobson et al., 1980, McNeil et al., 1980 und Erhart & Hollenberg, 1981) und dem Fehlen des Nachweises intramolekularer Mechanismen bisher primär einen intramolekularen Ablauf annahm (Broach & Hicks, 1980).

Die Wirkung des Tet-FLP-Gens in trans konnte mit Hilfe des Plasmids pGTT1 gezeigt werden. Es trägt ein Tet-FLP-Gen, kann aber selbst nicht rekombinieren, da die Rekombinations-Sequenzen in den IR-Elementen deletiert sind. In Gegenwart dieses Plasmids invertierten die flp-Testplasmide BTYP-1 und pJDB219, was nur durch eine Wirkung des FLP-Gens in trans zu erklären ist. Die Inversion dieser Plasmide scheint in Widerspruch zum Modell einer cis-Aktivität für die Rekombinationsbereitschaft zu stehen. Da die Inversion von BTYP-1 und pJDB219 jedoch nur sehr langsam abläuft, kann man sie gut mit einer geringen Aktivität der IR-Elemente in diesen Plasmiden erklären, deren Reaktion in Gegenwart rekombinationsaktiver IR-Elemente völlig überdeckt wird.

Bei der intermolekularen Rekombination zwischen koexistenten Plasmiden waren Rekombinantplasmide vom Typ pG53BD-K21 aufgetreten. Sie fielen dadurch auf, daß sie zwei vollständige bakterielle Vektoren mit Resistenzgenen und jeweils einem Replikationsursprung enthielten. Die beiden Replikons stammen aus ColE1 bzw. p15A und sind über große Bereiche homolog (Selzer et al., 1982), aber trotzdem miteinander kompatibel. Durch die Inversion der Rekombinantplasmide

kommen die Replikons in beiden Orientierungen zueinander vor. Es ist erstaunlich, daß weder die direkte noch invertierte Anordnung zweier Replikons ähnlichen Typs auf einem Molekül zur Instabilität des Plasmids führt. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Initiation der Replikation das Plasmid in einen Zustand versetzt, der eine weitere Initiation ausschließt. Auch Timmis et al. (1974) und Cabello et al. (1976) erzielten ähnliche Ergebnisse. Dabei waren allerdings Replikons verwendet worden, die ganz verschiedene Replikationsmechanismen verwenden. Ebenfalls beeinflussen zwei Amp^R-Gene in direkter oder invertierter Anordnung die Stabilität des Plasmids in $recA^-$-Stämmen von E.coli nicht. Damit ist gezeigt, daß das FLP-Rekombinationssystem diese Duplikationen nicht erkennt. Im Gegensatz hierzu wurde von Broach et al. (1982) berichtet, daß eine FLP-abhängige Rekombination in Hefe auch mit geringerer Frequenz über Sequenzen des bakteriellen Transposons Tn5 stattfindet.

Das Auftreten von Kointegrationsplasmiden mit vier IR-Elementen in relativ hoher Konzentration (bis ca. 12%) ist erstaunlich. In einem Teil der Cotransformanten fiel eines dieser Kointegrationsplasmide durch die intensive Bande eines Restriktionsfragments auf (4.6.1, s. Abb.23D). Daraus kann man ableiten, daß in E.coli nicht alle möglichen Kombinationen von IR-Elementen gleich häufig rekombinieren. Dieses Kointegrationsplasmid entspricht in seinem Aufbau dem aus Transkriptionsdaten geforderten Dimeren in Abb.31A (s. 5.3 und 5.4).

Dies ist ein interessanter Befund, doch ist es bis jetzt nicht möglich, die Hypothese einer FLP-unabhängigen Entstehung von Dimeren und dem FLP-abhängigen Zerfall in invertierte Monomere aus dem Transkriptionsmodell mit den Daten der FLP-abhängigen Rekombinanten in E.coli in Einklang zu bringen.

Es bleibt auch offen, ob die 2µm-DNA überhaupt durch intramolekulare Rekombination interkonvertieren kann. In diesem Zusammenhang muß darauf hingewiesen werden, daß keineswegs sicher ist, daß die FLP-abhängige Rekombination nach dem klassischen Holliday-Modell (Holliday, 1964; Meselson & Radding,1979) abläuft. Es könnten auch ganz andere Mechanismen vorliegen wie sie zum Beispiel für die replikations-gekoppelte Transposition bakterieller Transposons vorgeschlagen wurden (Galas & Chandler, 1981).

Über die vorliegenden Ergebnisse hinaus hat die funktionelle Expression des FLP-Gens in E.coli allgemeine Bedeutung für die Untersuchung des FLP-abhängigen Rekombinationssystems von Hefe. Da dieses System losgelöst vom genetischen Hintergrund der Hefe im heterologen Organismus funktioniert, kann leicht untersucht werden, ob andere Gene mit Wirkung auf Rekombination, Synthese oder Topologie der DNA an der FLP-abhängigen Rekombination beteiligt sind. Die gentechnologische Überproduktion sollte die Gewinnung reinen FLP-Proteins und die in vitro-Untersuchung dieser interessanten spezifischen Rekombination eines Eukaryonten ermöglichen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die in vivo-Transkription und Rekombination der 2µm-DNA aus der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae und davon abgeleiteter Rekombinantplasmide untersucht. Mit Hilfe der "Northern"-Technik können 11 Transkripte der 2µm-DNA nachgewiesen und kartiert werden, von denen jeweils weniger als 3 Moleküle pro Zelle vorkommen. Die Transkriptionskarte von Broach et al. (1979) wird verbessert und es wird gezeigt, daß von den 3 Genen und dem Leserahmen D der 2µm-DNA spezifische Transkripte abgelesen werden. Die anderen RNAs, darunter eine relativ(!) häufige, codieren vermutlich nicht für Proteine.

Von den Derivaten der 2µm-DNA, 2µmLEU2-DNA (Dobson et al., 1980) und pJDB219 (Beggs, 1979), werden die gleichen RNAs transkribiert, sofern ihr Transkriptionsbereich nicht durch die DNA-Insertion unterbrochen ist. Die Ergebnisse dieser RNA-Kartierungen führen zu einem Modell der Transkription von 2µm-DNA und ihren Derivaten, das die Expression aller Gene der 2µm-DNA erlaubt unabhängig von der Orientierung des L- und S-Segments zueinander: Es werden nur solche dimere Plasmide transkribiert, in denen große Primärtranskripte entstehen können, welche in einem Molekül die Sequenzen beider DNA-Einzelstränge enthalten. Aus ihnen entstehen in einer Folge von Prozessierungsschritten die reifen RNAs.
Die Transkriptionskarte der 2µmLEU2-DNA, die ein am 5'-Ende deletiertes LEU2-Fragment enthält, ergibt Hinweise darauf, daß das LEU2-Gen ein Intron enthält. Die Expression des intakten LEU2-Gens könnte möglicherweise über die Zugänglichkeit der 5'-Spleißstelle im Primärtranskript positiv reguliert werden. Eine weitere positive Kontrolle des LEU2-Gens durch Veränderung der DNA-Topologie über eine interne Regulatorsequenz wird vorgeschlagen.

In dieser Arbeit wird die Expression des FLP-Gens der 2µm-DNA in E.coli beschrieben. Dieses Gen ist notwendig für die spezifische Rekombination, die zur Inversion der Segmente von 2µm-DNA führt (Broach & Hicks, 1980). Das Produkt seiner Fusion mit dem Tet^R-Gen ist in E.coli und Hefe funktionell aktiv. Untersuchungen mit zwei koexistenten Plasmiden in E.coli ergaben, daß das FLP-Gen in trans wirkt und ein Effekt existiert, der in cis die Rekombinationsbereitschaft der Plasmide stark erhöht. Diese FLP-abhängige Rekombination ist ein genetisch und enzymatisch sehr einfaches System, das sich gut als Modellsystem für spezifische Rekombination in Eukaryonten eignet.

7. Literaturverzeichnis

Alwine, J.C., Kemp. D.J. und Stark, G.R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-5354.

Alwine, J.C., Kemp. D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R. und Wahl G.M. (1980) Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl-paper. Methods Enzymol. 68, 220-242.

Andreadis, A., Hsu, Y.P., Kohlhaw, G.B., Hermodson, M. und Schimmel, P. (1982) Nucleotide sequence of yeast LEU2 shows 5'-noncoding region has sequences cognate to leucine. Cell 31, 319-325.

Aviv, H. und Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412.

Bach, M-L., Lacroute, F. und Botstein, D. (1979) Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 386-390.

Banerji, J., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1981) Expression of a ß-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. Cell 27, 299-308.

Beggs, J.D. (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature 275, 104-109.

Beggs, J.D., Guerineau, M. und Atkins, J.F. (1976) A map of the restriction targets in yeast 2 micron plasmid DNA cloned on bacteriophage lambda. Molec. gen. Genet. 148, 287-294.

Beggs, J.D., van den Berg, J., van Ooyen, A. und Weissmann, C (1980) Abnormal expression of chromosomal rabbit ß-globin gene in Saccharomyces cerevisiae. Nature 283, 835-840.

Bell, G. und Byers, B. (1979) Occurrence of crossed strand-exchange forms in yeast DNA during meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3445-3449.

Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977) Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 180-182.

Berk, A.J. und Sharp, P.A. (1977) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. Cell 12, 721-732.

Blanc, H., Gerbaud, C., Slonimski, P.P. und Guerineau, M. (1979) Stable yeast transformation with chimeric plasmids using a 2µm-circular DNA-less strain as a recipient. Molec. gen. Genet. 176, 335-342.

Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J. Cell. Biol. 67, 835-851.

Bolivar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique EcoRI sites for selection of EcoRI generated recombinant DNA molecules. Gene 4, 121-136.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C. und Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. Gene 2, 75-93.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. und Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-113.

Bonitz, S.G., Berlani, R., Coruzzi, G., Li, M., Macino, G., Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., Thalenfeld, B.E. und Tzagoloff, A. (1980) Codon recognition rules in yeast mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3167-3170.

Breathnach, R. und Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383.

Breunig, K.D., Mackedonski, V. und Hollenberg, C.P. (1982) Transcription of the bacterial ß-lactamase gene in Saccharomyces cerevisiae. Gene 20, 1-10.

Brewer, B.J. und Fangman, W.L. (1980) Preferential inclusion of extrachromosomal genetic elements in yeast meiotic spores. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5380-5384.

Broach, J.R. (1981) The yeast 2µ circle. In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Life Cycle and Inheritance. Eds. Strathern, Jones & Broach, Cold Spring Harbor Laboratory 11A, 445-470.

Broach, J.R. (1982) The yeast plasmid 2µm circle. Cell 28, 203-204.

Broach, J.R., Atkins, J.F., McGill, C. und Chow, L. (1979) Identification and mapping of the transcriptional and translational products of the yeast plasmid, 2µ circle. Cell 16, 827-839.

Broach, J.R., Guarascio, V.R. und Jayaram, M. (1982) Recombination within the yeast plasmid 2µ circle is site-specific. Cell 29, 227-234.

Broach, J.R., Guarascio, V.R., Misiewicz, M.H. und Campbell, I.L. (1981) Replication of the yeast 2µ circle. In: Molecular Genetics in Yeast, eds. von Wettstein, Friis, Kielland-Brandt & Stenderup, Munksgaard, Copenhagen, Alfred Benzon Symp. 16, 227-236.

Broach, J.R. und Hicks, J.B. (1980) Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2µ circle. Cell 21, 501-508.

Bukhari, A.I. (1981) Models of DNA transposition. Trends Biochem. Sci. 6, 56-60.

Bukhari, A.I. und Ambrosio, L. (1978) The invertible segment of bacteriophage Mu DNA determines the adsorption properties of Mu particles. Nature 271, 575-577.

Cabello, F., Timmis, K. und Cohen, S.N. (1976) Replication control in a composite plasmid constructed by in vitro linkage of two distinct replicons. Nature 259, 285-290.

Cameron, J.R., Philippsen, P. and Davis, R.W. (1977) Analysis of chromosomal integration and deletion of yeast plasmids. Nucl. Acids Res. 4, 1429-1448.

Carnevali, F., Caserta, M. und DiMauro, E. (1983) Topological modifications and template activation are induced in chimaeric plasmids by inserted sequences. J. Mol. Biol. 165, 59-77.

Chang, A.C.Y. und Cohen, S. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134, 1141-1156.

Chia, L.-L. und McLaughlin, C. (1979) The half-life of mRNA in Saccharomyces cerevisiae. Molec. gen. Genet. 170, 137-144.

Clark-Walker, G.D. (1972) Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 388-392.

Clark-Walker, G.D. (1973) Size distribution of circular DNA from petite-mutant yeast lacking ϱDNA. Eur. J. Biochem. 32, 263-267.

Clark-Walker, G.D. und Miklos, G.L. (1974) Localization and quantification of circular DNA in yeast. Eur. J. Biochem. 41, 359-365.

Clewell, D.B. und Helinski, D.R. (1969) Supercoiled DNA protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an open circular form. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1159-1166.

Cohen, J.D., Eccleshall, T.R., Needleman, R.B., Federoff, H., Buchferer, B.A. und Marmur, J. (1980) Functional expression in yeast of the Escherichia coli plasmid gene coding for chloramphenicol acetyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1078-1082.

Collins, J. (1981) Instability of palindromic DNA in Escherichia coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 45, 409-416.

Denis, C.L., Ciriacy, M. und Young, E.T. (1981) A positive regulatory gene is required for accumulation of the functional messenger RNAs for the glucose-repressible alcohol dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. J. Mol. Biol. 148, 355-368.

Dobson, M.J., Futcher, A.B. und Cox, B.S. (1980) Control of recombination within and between DNA plasmids of Saccharomyces cerevisiae. Curr. Gen. 2, 193-200.

Doolittle, W.F. und Sapienza, C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. Nature 284, 601-603.

Dreiseikelmann, B., Eichenlaub, R. und Wackernagel, W. (1979) The effect of differential methylation by Escherichia coli of plasmid DNA and phage T7 and λ DNA on the cleavage by restriction endonuclease MboI from Moraxella bovis. Biochim. Biophys. Acta 562, 418-428.

Dretzen, G., Bellard, M., Sassono-Corsi, P. und Chambon, P. (1981) A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. Anal. Biochem. 112, 295-298.

Elder, R.T., StJohn, T.P., Stinchcomb, D.T. und Davis, R.W. (1981) Studies on the transposable element Ty1 of yeast. I. RNA homologous to Ty1. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 45, 581-584.

Erhart, E.: Wechselwirkungen zwischen 2µm-DNA und abgeleiteten Plasmiden in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae. Dissertation Düsseldorf, 1983.

Erhart, E. und Hollenberg, C.P. (1981) Curing of Saccharomyces cerevisiae 2µm-DNA by transformation. Curr. Gen. 3, 83-89.

Falco, C.S., Li, Y., Broach, J.R. und Botstein, D. (1982) Genetic properties of chromosomally integrated 2µm plasmid DNA in yeast. Cell 29, 573-584.

Felber, B.K., Orkin, S.H. und Hamer, D.H. (1982) Abnormal RNA splicing causes one form of thalassemia. Cell 29, 895-902.

Galas, D.J. und Chandler, M. (1981) On the molecular mechanisms of transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4858-4862.

Gallwitz, D. und Sures, I. (1980) Structure of a split yeast gene: Complete nucleotide sequence of the actin gene in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2546-2550.

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T. und Tomizawa, J.-I. (1977) Nalidixic acid resistance. A second character involved in DNA gyrase activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4772-4776.

Gerbaud, C., Fournier, P., Blanc, H., Aigle, M., Heslot, H. und Guérineau, M. (1979) High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2µm yeast plasmid. Gene 5, 233-253.

Gubbins, E.J., Newlon, C.S., Kann, M.D. und Donelson, J.E. (1977) Sequence organization and expression of a yeast plasmid DNA. Gene 1, 185-207.

Guérineau, M. (1977) Expression of a yeast episome: RNA-DNA hybridization studies. FEBS Lett. 80, 426-428.

Guérineau, M., Grandchamp, C., Paoletti, C. und Slonimski, P.P. (1971) Characterization of a new class of circular DNA molecules in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 550-557.

Guérineau,M., Grandchamp, C. und Slonimski, P.P. (1976) Circular DNA of a yeast episome with two inverted repeats: Structural analysis by a restriction enzyme and electron microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3030-3034.

Hartley, J.L. und Donelson, J.E. (1980) Nucleotide sequence of the yeast plasmid. Nature 286, 860-865..

Herrmann, R., Neugebauer, K., Pirkl, E., Zentgraf, H. und Schaller, H. (1980) Conversion of bacteriophage fd into an efficient single-stranded DNA vector system. Mol. gen. Genet. 177, 231-242.

Hicks, J.B., Hinnen, A. und Fink, G.R. (1979) Properties of yeast transformation. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 1305-1313.

Hillen, W. und Schollmeier, K. (1983) Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. Nucl. Acids Res. 11, 525-539.

Hinnen, A., Hicks, J.B. und Fink, G.R. (1978) Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933.

Hitzeman, R.A., Hagie, F.E., Levine, H.L., Goeddel, D.V., Ammerer, G. und Hall, B.D. (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. Nature 293, 717-722.

Hollenberg, C.P. (1978) Mapping of regions on cloned Saccharomyces cerevisiae 2µm-DNA coding for polypeptides synthesized in Escherichia coli minicells. Molec. gen. Genet. 162, 23-34.

Hollenberg, C.P. (1979) The expression in Saccharomyces cerevisiae of bacterial ß-lactamase and other antibiotic resistance genes integrated in a 2µm-DNA vector. In: Extrachromosomal DNA, eds. Cummings, Borst, Dawid, Weissman & Fox. ICN-UCLA Symp. Mol. Cell.Biol. 15, 325-338, Academic Press New York.

Hollenberg, C.P. (1982) Cloning with 2µm-DNA vectors and the expression of foreign genes in Saccharomyces cerevisiae. Current Topics Microbiol. Immunol. 96, 119-144.

Hollenberg, C.P., Borst, P. und van Bruggen, E.F.J. (1970) Mitochondrial DNA. V. A 25-µ closed circular duplex DNA molecule in wild-type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity. Biochim. Biophys. Acta 209, 1-15.

Hollenberg, C.P. und Royer, H.-D.: Electron microscopical analysis of native and cloned 2µm-DNA from Saccharomyces cerevisiae. In: Genetics and biogenesis of chloroplasts and mitochondria. Ed.: Slonimski & Bücher, Elsevier/North-Holland, Amsterdam (1976).

Holliday, R. (1964) A mechanism for gene conversion in fungi. Genet. Res. 5, 282-304.

Holmes, D.S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.

Hsiao, C.L. und Carbon, J. (1979) High frequency transformation of yeast by plasmids containing the cloned yeast ARG4 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3829-3833.

Hsiao, C.L. und Carbon, J. (1981) Characterization of a yeast replication origin (ARS2) and construction of stable minichromosomes containing cloned yeast centromere DNA (CEN3). Gene 15, 157-166.

Irani, M.H., Orosz, L. und Adhya, S. (1983) A control element within a structural gene: The gal operon of Escherichia coli. Cell 32, 783-788.

Janowicz, Z.A., Hennig, U. und Hollenberg, C.P. (1983) Synthesis of the Escherichia coli outer membrane OmpA protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Gene 20, 347-358.

Kielland-Brandt, M.C., Nilsson-Tillgren, T., Holmberg, S., Petersen, J.G.L. und Svenningsen, B.A. (1979) Transformation of yeast without the use of foreign DNA. Carlsberg Res. Commun. 44, 77-87.

Kingsman, A.J., Clarke, L., Mortimer, R.K. und Carbon, J. (1979) Replication in Saccharomyces cerevisiae of plasmid pBR313 carrying DNA from the yeast TRP1 region. Gene 7, 141-152.

Koch, H. und Friesen, J.D. (1979) Individual messenger half lives in Saccharomyces cerevisiae. Molec. gen. Genet. 170, 129-135.

Kohlhaw, G.B. (1982) Regulation of leucine biosynthesis in lower eukaryotes. In: Biotechnology I, Amino acid biosynthesis and genetic regulation. Herrmann & Somerville (Hsg.) Addison Wesley, Reading (Mass.), im Druck.

Kozak, M. (1980) Evaluation of the "Scanning Model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes. Cell 22, 7-8.

Langford, C., Nellen, W., Niessing, J. und Gallwitz, D. (1983) Yeast is unable to excise foreign intervening sequences from hybrid gene transcripts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1496-1500.

Lilley, D.M.J. (1981a) Hairpin-loop formation by inverted repeats in supercoiled DNA is a local and transmissible property. Nucl. Acids Res. 9, 1272-1289.

Lilley, D.M.J. (1981b) In vivo consequences of plasmid topology. Nature, 292, 380-382.

Livingston, D.M. (1977) Inheritance of the 2µm-DNA-plasmid from Saccharomyces. Genetics 86, 73-84.

Livingston, D.M. und Hahne, S. (1979) Isolation of a condensed, intracellular form of the 2µm-DNA plasmid of Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3727-3731.

Livingston, D.M. und Klein, H.L. (1977) Deoxyribonucleic acid sequence organization of a yeast plasmid. J. Bacteriol. 129, 472-481.

Livingston, D.M. und Kupfer, D.M. (1977) Control of Saccharomyces 2µm-DNA replication by cell division cell cycle genes that control nuclear DNA replication. J. Mol. Biol. 116, 249-260.

Lovett, M.A., Katz, L. und Helinski, D.R. (1974) Unidirectional replication of plasmid ColE1 DNA. Nature 251, 337-340.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) in: Molecular Cloning. A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y.) S. 258.

Mandel, M. und Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 159-162.

McLaughlin, C.S., Warner, J.R., Edmonds, M., Nakazato, H. und Vaughan, M.H. (1973) Polyadenylic acid sequences in yeast messenger ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 248, 1466-1471.

McMaster, G.K. und Carmichael, G.G. (1977) Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4835-4838.

McMurry, L., Petrucci, R.E., Jr. und Levy, S.B. (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3974-3977.

McNeil, J.B., Storms, R.K. und Friesen, J.D. (1980) High frequency recombination and the expression of genes cloned on chimeric yeast plasmids: Identification of 2µm circle essential for transformation. Curr. Gen. 2, 17-25.

Mercereau-Puijalon, D., Lacroute, F. und Kourilsky, P. (1980) Synthesis of a chicken ovalbumin-like protein in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Gene 11, 163-167.

Meselson, M.S. und Radding, C.M. (1975) A general model for genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 358-361.

Mizuuchi, K. und Nash, H.A. (1976) Restriction assay for integrative recombination of bacteriophage λ DNA in vitro: Requirement for closed circular DNA substrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3524-3528.

Moreau, P., Hen, R. Wasylyk, B., Everett, R., Gaub, M.P. und Chambon, P. (1981) The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. Nucl. Acids Res. 9, 6047-6068.

Mount, S.M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. Nucl. Acids Res. 10, 459-472.

Nasmyth, K.A. (1982) The regulation of yeast mating-type chromatin structure by SIR: An action at a distance affecting both transcription and transposition. Cell 30, 567-578.

Nelson, R.G. und Fangman, W.L. (1979) Nucleosome organization of the yeast 2µm-DNA plasmid: a eukaryotic minichromosome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6515-6519.

Ng, R. und Abelson, J. (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3912-3916.

Orgel, L.E. und Crick, F.H.C. (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284, 604-607.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. und Rothstein, R.J. (1981) Yeast transformation: A model system for the study of recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6354-6358.

Petes, T.D. und Williamson, D.H. (1975) Replicating circular DNA molecules in yeast. Cell 4, 249-253.

Potter, H. und Dressler, D. (1978) In vitro system from Escherichia coli that catalyzes generalized genetic recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3698-3702.

Preibisch, G.: Anwendung der Northern-Technik zur Untersuchung der Transkription der 2µm-DNA in Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit Tübingen, 1979.

Prentki, P., Karch, F., Iida, S. und Meyer, J. (1981) The plasmid cloning vector pBR325 contains a 482 base-pair-long inverted duplication. Gene 14, 289-299.

Proudfoot, N.J. und Brownlee, G.G. (1976) 3'-noncoding region sequences in eucaryotic messenger RNA. Nature 263. 211-214.

Reipen, G. (1982) Optimierung der Expression des bakteriellen ß-Lactamasegens in Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, Düsseldorf.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to higher specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251.

Rodriguez, R., Bolivar, F., Goodman, H.M., Boyer, H.W. und Betlach, M. (1976) Construction and characterization of cloning vectors. In: Molecular mechanisms in the control of gene expression. Nierlich, Rutter & Fox (eds.) Academic Press Inc., New York. p. 471.

Royer, H.-D. und Hollenberg, C.P. (1977) Saccharomyces cerevisiae 2µm-DNA. An analysis of the monomer and its multimers by electron microscopy. Mol. gen. Genet. 150, 271-284.

Royer, H.-D. und Hollenberg, C.P. (1979) Mapping of Escherichia coli RNA polymerase binding sites on 2µm-DNA from Saccharomyces cerevisiae. Plasmid 2, 403-416.

Ryoji, M., Hsia, K. und Kaji, A. (1983) Read-through translation. Trends Biochem. Sci. 8, 88-90.

Seligy, V.L., Thomas, D.Y. und Miki, B.L.A. (1980) Saccharomyces cerevisiae plasmid, Scp or 2-µm: intracellular distribution, stability and nucleosomal-like packages. Nucl. Acids Res. 8, 3371-3391.

Selzer, G., Som, T., Itoh, T.und Tomizawa, J.-I. (1983) The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. Cell 32, 119-129.

Sinclair, J.H., Stevens, R.J., Sanghavi, P. und Rabinowitz, M. (1967) Mitochondrial-satellite and circular DNA filaments in yeast. Science 156, 1234-1237.

Singh, H., Bieker, J.J. und Dumas, L.B. (1982) Genetic transformation of Saccharomyces cerevisiae with single-stranded circular DNA vectors. Gene 20, 441-449.

Sherman, F. und Stewart, J.W. (1975) The use of iso-1-cytochrome c mutants of yeast for elucidating the nucleotide sequences that govern initiation of translation. In: Organization and expression of the eukaryotic genome. Proc. 10th FEBS Meeting 38, Bernardi & Gros (eds.) American Elsevier, New York, S. 175-191.

Sherman, F., Stewart, J.W. und Schweingruber, A.M. (1980) Mutants of yeast initiating translation of iso-1-cytochrome c within a region spanning 37 nucleotides. Cell 20, 215-222.

Smith, G.R. (1981) DNA supercoiling: Another level of regulating gene expression. Cell 24, 599-600.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stiles, J.I., Szostak, J.W., Young, A.T., Wu, R., Consaul, S. und Sherman, F. (1981) DNA sequence of a mutation in the leader region of the yeast iso-1-cytochrome c mRNA. Cell 25, 277-284.

Storms, R.K., McNeil,J.B., Khandekar, P.S., An, G., Parker, J. und Friesen, J.D. (1979) Chimeric plasmids for cloning of deoxyribonucleic acid sequences in Saccharomyces cerevisiae. J. Bacteriol. 140, 73-82.

Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S. und Davis, R.W. (1979) High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039.

Sutcliffe, J.G. (1978) Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.

Tabak, H.F. (1977) Absence of 2µm-DNA sequences in Saccharomyces cerevisiae Y 379-5D. FEBS Letters 84, 67-70.

Taketo, H., Jazwinski, S.M. und Edelman, G.M. (1980) Association of the 2µm-DNA plasmid with yeast folded chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3144-3148.

Thomas, D.Y. und James, A.P. (1980) Transformation of Saccharomyces cerevisiae with plasmids containing fragments of yeast 2µ DNA and a suppressor tRNA gene. Curr. Gen. 2, 9-16.

Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5201-5205.

Timmis, K. und Cohen, S.N. (1974) Utilization of two distinct modes of replication by a hybrid plasmid constructed in vitro from separate replicons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4556-4560.

Toh-E, A., Guerry-Kopecko, P. und Wickner, R.B. (1980) A stable plasmid carrying the yeast leu2 gene and containing only yeast DNA. J. Bacteriol. 141, 413-416.

Tomizawa, J.-I., Sakakibara, Y. und Kakefuda, T. (1974) Replication of Colicin E1 plasmid DNA in cell extracts. Origin and direction of replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2260-2264.

Treisman, R., Proudfoot, N.J., Shander, M. und Maniatis, T. (1982) A single-base change at a splice site in a ß°-thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. Cell 29, 903-911.

Van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P. und Grivell, L.A. (1979) Transcription map of mtDNA of two strains of Saccharomyces: Transcription of strain-specific insertions; complex RNA maturation and splicing. Cell 18, 511-523.

Weiss, R. und Gallant, J. (1983) Mechanism of ribosome frameshifting during translation of the genetic code. Nature 302, 389-393.

Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C. und Richardson, C.C. (1968) Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 243, 4543-4555.

Wieringa, B., Meyer, F., Reiser, J. und Weissmann, C. (1983) Unusual splice sites revealed by mutagenic inactivation of an authentic splice site of the rabbit ß-globin gene. Nature 301, 38-43.

Zakian, V.A., Brewer, B.J. und Fangman, W.L. (1979) Replication of each copy of the yeast 2µm-DNA plasmid occurs during the S-phase. Cell 17, 923-934.

Zaret, K.S. und Sherman, F. (1982) DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. Cell 28, 563-573.

Zieg, J., Silverman, M., Hilmen, M. und Simon, M. (1977) Recombinational switch for gene expression. Science 196, 170-172.

Zitomer, R.S. und Hall, B.D. (1976) Yeast Cytochrome c messenger RNA. In vitro translation and specific immunoprecipitation of the CYC1 gene product. J. Biol. Chem. 251, 6320-6326.

Zubay, G., Chambers,D.A. und Cheong, L.C. (1970) in: The Lactose Operon, eds. Beckwith, J.R. & Zipser, D. (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N.Y.) 375-391.

LEBENSLAUF

Gerald Preibisch
geboren am 19. Mai 1953 in Rastatt
verheiratet seit 1977
2 Kinder

1960 - 1964	Volksschule in Rastatt
1964 - 1972	Gymnasium in Rastatt
1972	Abitur am mathematisch-naturwissenschaftlichen Tulla-Gymnasium in Rastatt
ab WS 1972/73	Studium der Biochemie in Tübingen
Okt. 1975	Vordiplom in Biochemie
Mai 1978	mündliche Diplomprüfung in Biochemie
Juli 1978-April1979	Diplomarbeit bei Herrn Dr. Hollenberg am Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Beermann, Tübingen
seit Mai 1979	Doktorarbeit bei Herrn Professor Hollenberg
bis März 1980	am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen
bis Febr. 1983	am Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353